

CREIXEMENT TUMORAL I METABOLISME DE L'HOSTE: DUES CARES D'UNA MATEIXA MONEDA

JOSEP M. ARGILÉS, MARTA LLOVERA I FRANCISCO J. LÓPEZ-SORIANO

Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

RESUM

L'etiologia del càncer es basa fonamentalment en l'aparició d'un dany genètic en una cèl·lula que ocasiona una expressió anormal de determinats gens, els productes dels quals canvien dramàticament el fenotip cel·lular. Com a conseqüència d'aquest fet, les cèl·lules transformades adquireixen tota una sèrie de característiques bioquímiques que els donen un gran avantatge en la seva competició per substrats i factors tròfics amb les cèl·lules normals. El creixement tumoral induïx en l'hoste tot un seguit de canvis metabòlics que es tradueix en un profund desequilibri energètic com a conseqüència de l'elevat grau d'ineficiència metabòlica generat per la massa tumoral en creixement. El conjunt d'alteracions porta al pacient a una profunda caquèxia caracteritzada per una massiva pèrdua de pes i desgast muscular que sovint acaba amb la mort abans que el tumor hagi arribat a adquirir el màxim grau de malignitat. En els darrers anys s'ha pogut comprovar que gran part de les adaptacions metabòliques generades en resposta a l'estímul invasiu són conseqüència de l'acció de compostos alliberats per les pròpies cèl·lules del sistema immunitari de l'animal o individu portador del tumor. Per tot això, la futura recerca en el tractament del càncer ha d'ésser dirigida, d'una banda, a un millor coneixement del sistema bioquímic hoste-tumor i, d'una altra, al desenvolupament de nous fàrmacs antitumorals que tinguin en compte no només l'anihilació del tumor, sinó també la resposta metabòlica de l'hoste, responsable, en molts casos, de l'aparició del síndrome caquètic i, conseqüentment, de la mort del pacient.

MOTS CLAU: *creixement tumoral, hoste, metabolisme, citocines, caquèxia.*

SUMMARY

The ethiology of cancer is based on the appearance of a genetic damage in a cell that leads to an abnormal expression of some genes, resulting in important changes in their products which result in modifications in the cell's phenotype. As a result, the transformed cells incorporate a series of biochemical features that provide them with a great advantage in their competition for substrates and trophic factors with the normal cells. Tumour growth induces in the host a variety of metabolic changes that result in a profound energetic imbalance as a result of the high degree of energetic inefficiency generated by the growing tumour. The ensemble of metabolic alterations results in a profound cachectic state in the patient characterised by a massive weight loss and muscle wastage that often leads to death even before the tumour has reach the highest malignancy. In the last years, it has been demonstrated that the majority of the metabolic alterations generated in response to invasive stimuli are a consequence of a series of compounds generated by the host's immune system. It is for above reasons that future cancer research will concentrate, on the one hand, in a better understanding of the host-tumour system, and, on the other, in the development of new anticancer drugs designed not only to eradicate the tumour but also the metabolic response of the host, responsible in most cases, of the cachexia, and consequently, the patient's death.

KEY WORDS: *tumour growth, host, metabolism, cytokines, cachexia.*

L'AMBIENT METABÒLIC DEL CÀNCER

Un tumor pot ésser considerat com un autèntic paràsit que creix a expenses de l'hoste. Això repercuteix en el pacient amb una gran pèrdua de pes corporal i provoca un clar estat de caquèxia (Costa, 1977; Argilés i López-Soriano, 1990a; Argilés i López-Soriano, 1991a; Tisdale, 1991). De tota manera, i encara que és conegut que els tumors promouen una forta demanda energètica sobre l'hoste, atès el seu continuat drenatge de substrats i energia per als seus processos sintètics, no és clar que aquesta sigui l'única causa del procés caquètic associat al creixement maligne. En aquest sentit, el tumor podria, a més, promoure desacoblament de la fosforilació oxidativa i/o una activitat augmentada de cicles fútils (Young, 1977).

D'altra banda, en els últims anys ha existit una marcada controvèrsia sobre els substrats preferits i el control de la seva utilització, pels tumors per al seu creixement. De fet, les cèl·lules tumorals poden utilitzar qualsevol substrat: glucosa (Lazo, 1981; Lundholm *et al.*, 1982; Sauer i Dauchy, 1983), lípids (Baker *et al.*, 1974; Ookhtens i Baker, 1979; Thomson i Koons, 1981) o aminoàcids (Baker *et al.*, 1974; Pedersen, 1978; Ookhtens i Baker, 1979; Fürst *et al.*, 1981; Thomson i Koons, 1981; Carrascosa *et al.*, 1984), encara que la importància relativa depèn del tipus de tumor i del seu estadi de desenvolupament (Fürst *et al.*, 1981). Un dels objectius d'aquest treball és esbrinar els principals esdeveniments metabòlics que tenen lloc en el tumor i els teixits de l'hoste després de la invasió tumoral.

Alteracions metabòliques de l'hoste durant el creixement tumoral

El tumor, per poder créixer, necessita metabòlits que han d'ésser necessàriament subministrats per l'hoste. Quan la demanda tumoral és tan gran que l'hoste no la pot afrontar —això s'agreuja quan l'entrada energètica es redueix com a conseqüència d'una disminució de la ingesta—, es produeix una forta pèrdua de pes, malnutrició i, finalment, la mort. El creixement d'un tumor depèn bàsicament de la seva natura. En aquest sentit, diferents tipus de tumors experimentals de rata es classifiquen segons les seves característiques de creixement: de ràpid creixement (tumors ascítics, el carcinosarcoma de Walker 256 i diferents hepatomes de Morris), de creixement intermedi (la major part dels hepatomes de Morris i l'hepatoma de Reuber) i els de creixement lent (d'altres tipus d'hepatomes de Morris). La seva taxa de creixement es relaciona directament amb el seu grau de diferenciació: com menys diferenciats són, més rapidament creixen.

L'aparició del tumor afecta el metabolisme de l'hoste a dos nivells diferents. En primer lloc, produeix canvis en el metabolisme i ambient hormonal de l'hoste com a resultat de la competició per diferents metabòlits i factors tròfics que s'estableix entre el tumor i els teixits normals. En segon lloc, influeix alguns teixits de l'hoste disminuint el seu grau de diferenciació, alterant les seves característiques enzimàtiques, canviant el grau de sensibilitat a diferents hormones i alterant els sistemes de retroalimentació negativa que coordinen les activitats centrals i perifèriques de les glàndules endocrines.

Encara que les cèl·lules tumorals actuen drenant contínuament metabòlits de l'hoste —i per tant el col·loquen en un estat de «dejuni accelerat»—, la resposta metabòlica generada és bastant diferent de la que es produeix durant una simple situació de dejuni. En aquest sentit, la disminució del consum d'oxigen i la producció

de CO_2 normalment associada amb el dejuni no té sempre lloc en l'hoste (Waterhouse i Fenninger, 1971; Young, 1977). Així, en les primeres fases del dejuni, la mobilització de greixos augmenta pels baixos nivells d'insulina circulant i per l'augmentada resposta simpàtica de les cèl·lules adiposes (Cahill, 1970; Felig, 1979; Munro, 1982). Aquests esdeveniments metabòlics s'acompanyen d'una augmentada proteòlisi muscular amb un increment en l'alliberament d'aminoàcids, augmentada gluconeogènesi hepàtica i producció d'urea (Cahill, 1970; Felig, 1979; Munro, 1982). Les adaptacions metabòliques al dejuni van lligades a l'habilitat dels teixits per adaptar-se a la utilització tant d'àcids grassos com de cossos cetònics (Cahill, 1970; Felig, 1979; Munro, 1982). Les adaptacions metabòliques de l'hoste al creixement tumoral no segueixen el mateix patró encara que en comparteixen alguns aspectes. El reciclatge de lactat generat pel tumor té lloc juntament amb un augment en la utilització de cossos cetònics —especialment acetoacetat— per part de les cèl·lules tumorals (Fenselau *et al.*, 1975). En aquest sentit, les adaptacions metabòliques de l'hoste comparteixen aspectes amb les que es produeixen en situacions d'anòxia i dejuni, i, per tant, col·loquen l'hoste en una situació molt peculiar pel que fa al seu ambient metabòlic. Tant per a la glucosa (Warburg, 1930) com per als aminoàcids (Mider, 1951; Lepage *et al.*, 1952), el tumor actua com una autèntica «trampa metabòlica». El manteniment de les cèl·lules tumorals significa una disminució entròpica i implica un requeriment energètic molt important. D'una altra banda, la síntesi de bases nitrogenades i proteïnes ha d'ésser progressivament incrementada en les cèl·lules tumorals per poder permetre el creixement i desenvolupament de la massa tumoral. Totes aquestes circumstàncies col·loquen els teixits de l'hoste en una situació metabòlica on el balanç entre les fonts principals d'energia exògena i la ingesta total no pot ésser fàcilment previsible, i, per tant, només s'en poden apuntar les principals directrius.

La producció d'ATP per les cèl·lules tumorals: paper de la glucòlisi

Transport de glucosa

Els primers treballs sobre el metabolisme de la glucosa a les cèl·lules tumorals es remunten als estudis de Warburg (Warburg, 1930). Aquest autor demostrà que els tumors metabolitzen glucosa per via glucolítica amb una alta taxa, fins i tot en presència d'altres concentracions d'oxigen en el medi. En cèl·lules normals, aquesta situació es dona en condicions d'anaerobiosi. Estudis més recents han demostrat que les alteracions del metabolisme de la glucosa que es donen a cèl·lules tumorals estan íntimament associades a processos de transport, els quals porten a concentracions intracel·lulars augmentades de diferents substrats i intermediaris

(Holley, 1972; Bharghava, 1977). En aquest sentit, en cèl·lules transformades per virus (Weber *et al.*, 1984), existeix un transport accelerat de glucosa (vegeu la fig. 1). En aquest sentit, els teixits de l'hoste han de competir amb la massa tumoral per aquest substrat. A més, els baixos nivells intracel·lulars de glucosa en les cèl·lules tumorals generen un important gradient de concentració entre la sang de l'hoste i la massa tumoral, que afavoreix aquesta en la seva competició amb els teixits de l'hoste. Sembla, a més, que aquest augmentat transport no és insulino-dependent, atès que sovint s'observa hipoglucèmia en pacients afectats per tumors malignes paral·lelament amb nivells normals o fins baixos d'insulina (Jasani *et al.*, 1978; Schein *et al.*, 1979; Heber *et al.*, 1985). És per això pel que sembla que la hipoglucèmia de l'hoste no és conseqüència d'un excés d'insulina circulant.

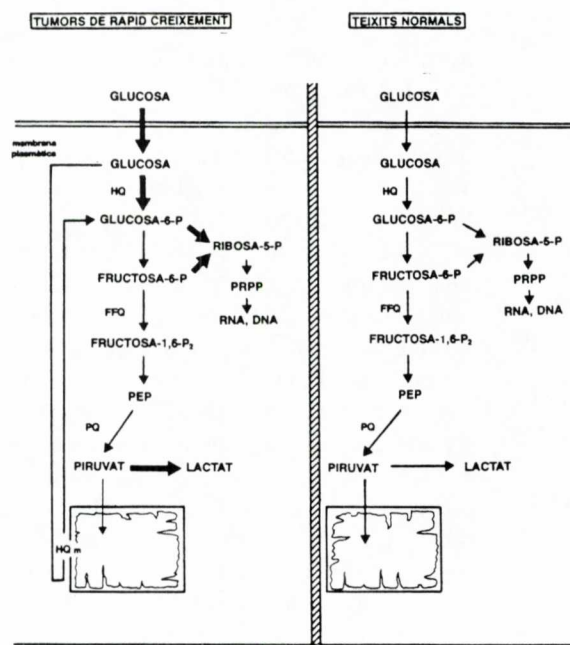


FIGURA 1. La via glucolítica en cèl·lules normals i tumorals.

La major part dels tipus cel·lulars malignes —tumors de ràpid creixement— metabolitzen la glucosa d'una manera característica i donen lloc a grans quantitats de lactat d'una manera similar a d'altres tipus cel·lulars com els eritròcits o determinats tipus de fibres musculars, en les quals el característic comportament glucolític és el resultat d'una manca de piruvat deshidrogenasa, o bé és fruit de l'anòxia que pateixen. En les cèl·lules tumorals l'alta activitat glucolítica consisteix en un gran flux a través de la via de les pentoses fosfat, la qual subministra els sucres necessaris per mantenir una important síntesi d'àcids nucleics. En les cèl·lules tumorals és característica la presència d'una hexoquinasa de membrana mitocondrial. (HQ = hexoquinasa, FFQ = fosfofructoquinasa, PQ = piruvat quinasa, PRPP = fosforribosil pirofosfat).

Resistència a la insulina

Encara que el transport de glucosa a les cèl·lules tumorals no sigui modulats per insulina, anormalitats en la secreció de l'hormona o en la sensibilitat de l'hoste a aquesta podrien explicar el patró d'intolerància a la glucosa que trobem en pacients afectats per processos neoplàstics. De fet, després de l'administració d'insulina a animals portadors de tumors, s'ha descrit una menor taxa d'aclariment de la glucosa, la qual cosa indica una relativa resistència a la insulina en aquest tipus de situació (Lundholm *et al.*, 1979b; Schein *et al.*, 1979).

Producció de lactat

El 1930 Warburg indicà que els tumors malignes tenien una alta taxa de glucòlisi en condicions aeròbiques, amb una manca quasi total d'efecte Pasteur (vegeu la fig. 2). En canvi, les cèl·lules tumorals presentaren un marcat efecte Crabtree. En aquest sentit, l'administració de glucosa a cèl·lules tumorals té com a conseqüència una inhibició del consum d'oxigen (Warburg, 1930), la qual cosa magnifica la dependència de glucosa com a font d'energia. D'altres tipus cel·lulars no presenten normalment aquest efecte, ja que mantenen bones taxes

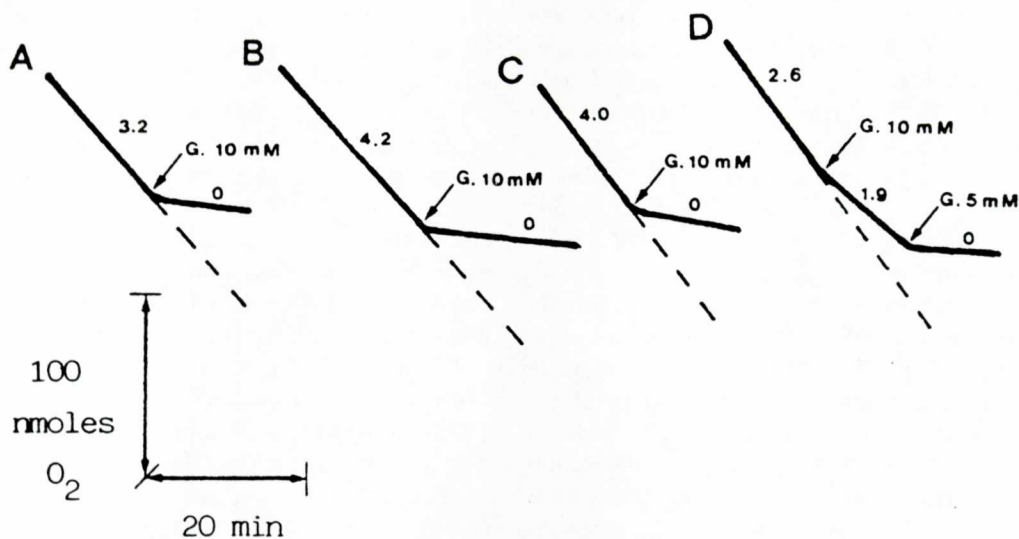


FIGURA 2. *Comportament respiratori de cèl·lules del carcinoma pulmonar de Lewis.*

Inhibició del consum d'oxigen en afegir glucosa (G) a cèl·lules tumorals (efecte Crabtree). Adaptat de Miralpeix *et al.* (1989).

respiratòries a partir d'altres substrats, fins i tot en presència de glucosa. Encara que avui en dia sabem que l'elevada taxa glucolítica no és l'únic factor important en el procés de transformació d'una cèl·lula normal en tumoral—hi ha cèl·lules tumorals capaces de créixer en medis sense glucosa (Weinhouse *et al.*, 1973; Zielke *et al.*, 1976)—, representa una característica molt general dels tumors més malignes (vegeu la fig. 1).

Una pregunta clau és per què hi ha una tendència tan notòria a transformar la glucosa en lactat en el citosol en lloc de transportar el piruvat generat glucolíticament a l'interior mitocondrial per a poder oxidar-lo totalment. Sembla que aquesta característica es relaciona més directament amb la malignitat del tumor que amb el seu propi creixement.

De fet, el grau de malignitat d'un tumor és directament proporcional a la seva producció aeròbica de lactat (Pedersen, 1978). També en teixits no cancerosos, com els embrionaris, existeix una alta taxa glucolítica. Sembla, doncs, que com menys diferenciada és una cèl·lula més profundes són les alteracions en la seva taxa glucolítica i en la seva respiració (Pedersen, 1978).

Les conseqüències metabòliques d'aquest alterat comportament metabòlic són molt clares. El tumor genera un elevat grau d'ineficiència metabòlica en l'hoste, a través de l'operació de processos dissipadors d'energia, com el cicle de Cori que s'estableix entre el tumor i el fetge (Young, 1977; Holroyde *et al.*, 1978) (vegeu la fig. 3). Com a resultat de l'alta taxa glucolítica, una part molt important del piruvat generat, juntament amb l'augment del quocient citosòlic NADH/NAD⁺, és convertit a lactat mitjançant la lactat deshidrogenasa. Això és, a més, potenciat pel baix contingut mitocondrial de les cèl·lules tumorals (LaNoue *et al.*, 1974; Cederbaum *et al.*, 1976; Pedersen, 1978) la qual cosa limita la possibilitat de dissipació de NADH a través de la cadena de transport electrònic mitocondrial, i també per la baixa activitat dels sistemes translocadors d'electrons associats a NADH a través de la membrana mitocondrial interna (Boxer i Devlin, 1961; LaNoue *et al.*, 1974;

Pérez-Rodríguez *et al.*, 1987). D'aquesta manera, la cèl·lula tumoral es converteix en una exportadora de lactat, d'una manera similar a la de certes fibres musculars en condicions d'anòxia (Cori, 1981). L'alta concentració circulante de lactat—aquest és el principal substrat per a la síntesi de glucosa (Exton, 1972)— augmenta la disponibilitat hepàtica d'aquest compost amb vista a la gluconeogènesi (vegeu la fig. 3). Encara que el paper precís del cicle de Cori en estats tumorals no ha estat clarament establert, afegeix un grau d'ineficiència clar en l'hoste, de manera que en lloc de la formació de 36-38 molècules d'ATP durant l'oxidació completa de glucosa a CO₂, es produeix una pèrdua de quatre molècules d'ATP cada vegada que una de lactat és transformada a glucosa. A pesar que part del lactat pot ésser captat, transformat a piruvat i oxidat a través del cicle de Krebs per alguns teixits, és clar que la síntesi massiva de lactat que té lloc en la massa tumoral genera una ineficiència metabòlica massiva que contribueix, sens dubte, a la caquèxia que té lloc en l'hoste.

Ha d'ésser remarcat que l'actiu transport de glucosa que s'observa en les cèl·lules tumorals és acompanyat per altes activitats dels enzims glucolítics (vegeu la fig. 1). A més, les característiques cinètiques d'alguns enzims glucolítics són marcadament distintives en determinats tipus de tumors. Així, en tumors d'estómac, pulmó, ovari i úter humans, s'ha trobat una K_M per a l'enzim hexoquinasa deu vegades més baixa que en teixits sans (Shapot, 1979). Tanmateix, s'ha descrit una forma d'hexoquinasa lligada a la membrana mitocondrial present en la major part de tumors de ràpid creixement (Hochstein, 1957; Geiger, 1963; Rose i Warms, 1967; Koobs, 1972). Aquest enzim permet una fosforilació de la glucosa molt més eficient pel fet que pot aprofitar millor l'ATP generat en el procés de la fosforilació oxidativa. Una vegada més trobem, doncs, evidències que apunten al fet que el tumor es col·loca en una posició més avantatjosa respecte als teixits normals de l'hoste en la competició per les molècules de glucosa.

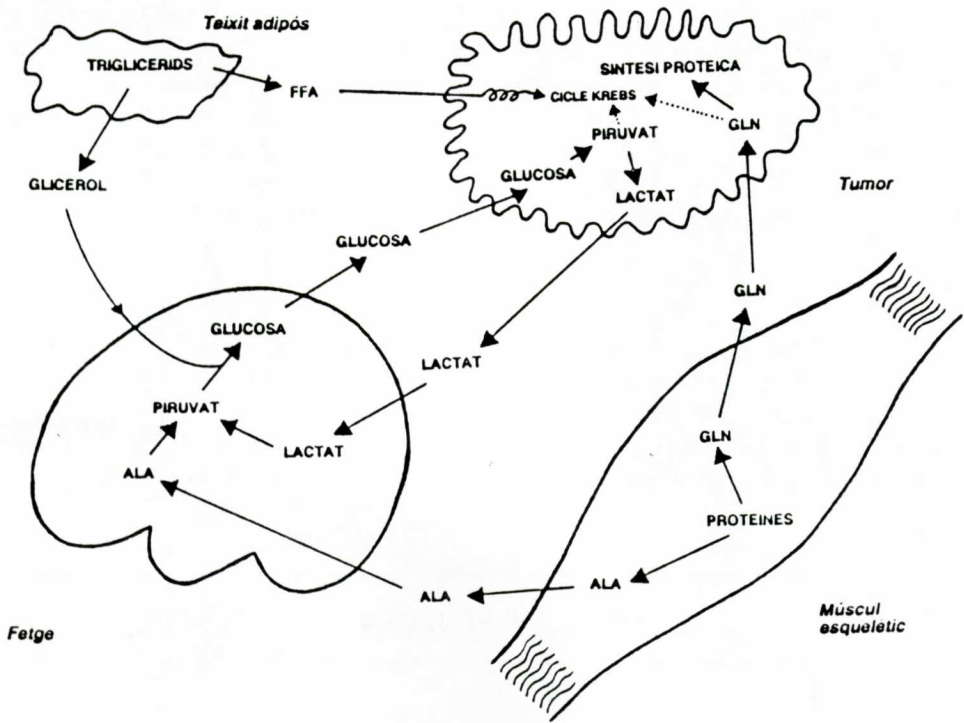


FIGURA 3. *Interrelacions metabòliques en l'hoste.*

L'ambient metabòlic de l'hoste es caracteritza per una intensa activitat tant del cicle de Cori com del de la glucosa-alanina. D'aquesta manera el tumor induïx proteòlisi a la major part dels teixits de l'hoste —especialment el múscul esquelètic—, la qual cosa porta a un important augment de les concentracions circulants d'alanina i glutamina. L'alanina és un substrat gluconeogènic molt bo que es canalitza cap al fetge per la síntesi de glucosa amb la finalitat d'atendre l'elevada demanda tumoral de sucre; el tumor l'oxida per via glucolítica i genera lactat, que és alliberat a la circulació. La massa tumoral també utilitza aminoàcids —especialment glutamina— o àcids grassos del teixit adipós com a substrats energètics alternatius per sostenir el seu creixement.

Hi ha un aspecte, però, que cal tenir en compte. No tots els models experimentals de creixement tumoral col·loquen l'hoste en una situació d'hipoglucèmia. Això és degut al fet que la maquinària metabòlica de l'hoste respon amb tot el seu potencial per contrarestar la demanda tumoral de la glucosa; això s'aconsegueix amb l'activació de la glicogenòlisi i de la gluconeogènesi hepàtiques. Encara que la primera d'aquestes vies metabòliques només pot jugar un paper secundari en el manteniment de la

normoglucèmia en l'hoste, probablement actua com a mecanisme compensatori activant la gluconeogènesi a partir de lactat i d'aminoàcids.

Un altre factor important que pot contribuir a explicar l'elevada taxa glucolítica de les cèl·lules tumorals és l'alta activitat de l'ATPasa Na^+ i K^+ dependent de la membrana plasmàtica cel·lular (Argilés i López-Soriano, 1990b). Aquesta activitat és conseqüència d'un funcionament defectuós d'aquest tipus de bomba que opera amb una gran ineficiència en la

utilització d'ATP. Tal com va dir Racker (Racker, 1972; Racker, 1976): «L'ATPasa és el pas limitador en el procés glucolític», ja que hi ha una limitació d'ATP, la disponibilitat d'aquest compost és vital per a l'activitat de la piruvat quinasa i la producció de lactat.

Gluconeogènesi

El procés de síntesi de glucosa té lloc en el fetge i l'escorça renal a partir d'un nombre variat de substrats com lactat, glicerol i aminoàcids.

Es tracta d'un procés amb un clar requeriment energètic, per la qual cosa la seva activació

comportarà una forta càrrega energètica en l'hoste (vegeu la fig. 4). Mitjançant la utilització de traçadors radioactius s'ha pogut comprovar que en estats d'invasió tumoral la gluconeogènesi hepàtica es troba activada (Waterhouse *et al.*, 1979; Holroyde i Reichard, 1981) (vegeu la fig. 3). No és fàcil esbrinar quin és el senyal metabòlic que activa aquest procés. En aquest sentit, el procés es troba sota un acurat control metabòlic i hormonal, i és inhibida per la insulina (Claus i Pilkis, 1976) i activada pel glucagó (Claus *et al.*, 1975), les catecolamines (Clark i Patten, 1981) i els glucocorticoides (Exton i Park, 1979; Postle i Bloxham, 1982). Com s'ha assenyalat prèviament, en moltes situacions tumorals els nivells d'insulina són més baixos i no hi ha

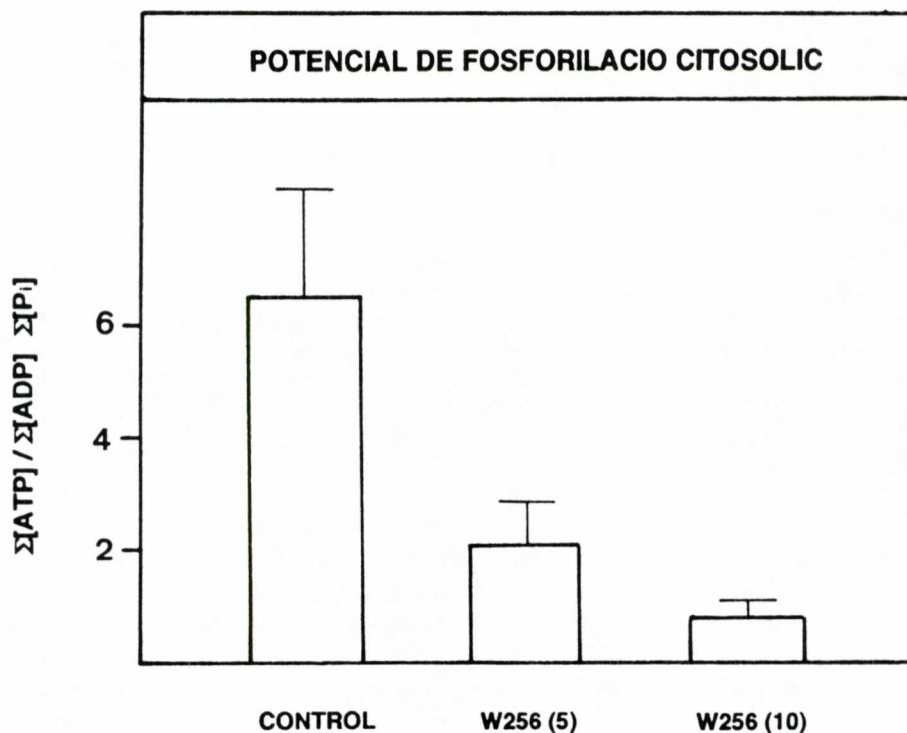


FIGURA 4. Potencial de fosforilació citosòlic en rates portadores d'un tumor de ràpid creixement.

Rates portadores del carcinosarcoma de Walker 256 de cinc (W256 (5)) i deu dies (W256 (10)). Adaptat d'Argilés i López-Soriano (1991b).

tampoc canvis en les altres hormones indicades a excepció dels glucocorticoides, els nivells dels quals són elevats tant en pacients afectats per tumors malignes (Sáez, 1971) com en animals portadors de tumors invasius (Argilés *et al.*, 1989b). Per tot això, el paper d'aquestes hormones és clau en el procés d'activació esmentat.

Contingut mitocondrial i cadena respiratòria

A les cèl·lules canceroses, la morfologia i capacitat dels mitocondris per experimentar canvis conformationals es troben alterades en relació amb les cèl·lules normals (Schneider i Hogeboom, 1950). A més, el nombre de mitocondris és també menor (Pedersen, 1978). Com a conseqüència, la capacitat respiratòria de les cèl·lules tumorals es troba disminuïda (Miralpeix *et al.*, 1989; Miralpeix *et al.*, 1990), per la qual cosa es veuen obligades a mantenir una alta taxa glucolítica, com hem esmentat prèviament. La reducció del contingut mitocondrial no sembla relacionada amb el creixement tumoral sinó més aviat amb la transició neoplàstica. En aquest sentit, els tumors de creixement ràpid —els menys diferenciats— tenen els nombres més baixos. De fet, es pot establir un gran paral·lelisme entre el comportament bioenergètic del tumor i els teixits fetals on el contingut mitocondrial és clarament reduït (Schreiber *et al.*, 1970). Així, la transició neoplàstica s'associa amb l'aparició d'isoenzims amb característiques fetals tant en el mitocondri com en el citosol (Pedersen, 1978).

Encara que alguns tipus de mitocondris tumorals tenen alguna deficiència en algun component de la cadena respiratòria (LaNoue *et al.*, 1974; Wallach, 1975) o bé en enzims que participen en l'entrada d'electrons de substrats a la cadena respiratòria, s'ha pogut comprovar la inexistència d'un defecte global en la capacitat respiratòria de les cèl·lules tumorals (Pedersen,

1978). Conseqüentment, la disminuïda capacitat respiratòria d'aquestes cèl·lules no és fruit d'una inhibició de la cadena de transport electrònic, sinó que és simplement conseqüència d'un disminuït contingut mitocondrial.

Un aspecte molt interessant relacionat amb els mitocondris de les cèl·lules tumorals és la disminuïda capacitat existent en aquests per catalitzar el trencament hidrolític de l'ATP en presència d'agents desacobladors com el 2,4-dinitrofenol (Pedersen i Morris, 1974). Encara que no s'entén gaire bé el mecanisme pel qual es dona aquest efecte, el seu paper podria estar relacionat amb el fet de proporcionar un altre avantatge a les cèl·lules tumorals. D'aquesta manera, l'ATP generat extramitocondrialment podria ser conservat fins i tot en presència d'agents desacobladors alliberats exògenament a partir de cèl·lules necròtiques.

Es podria pensar que les cèl·lules canceroses produeixen compostos capaços d'ésser transportats a tipus cel·lulars normals, on podrien actuar desacoblant la fosforilació oxidativa i, per tant, minvant la producció d'ATP i contribuint a l'estat caquètic de l'hoste en augmentar la ineficiència de processos metabòlics bàsics. De fet, s'ha vist que determinats peròxids d'àcids grassos insaturats podrien contribuir a aquest fenomen. Així es produeix una acumulació d'aquests compostos en animals portadors del carcinoma ascític d'Ehrlich i en animals amb sarcomes primaris induïts per 3,4-benzopirè (Shapot, 1979). Aquests compostos s'acumulen com a conseqüència d'una major producció a través del sistema de la dioxigenasa microsomal dependent de NADH juntament amb una menor eliminació per la superòxid dismutasa i glutatió peroxidasa. En animals portadors del sarcoma 45 de creixement lent i del carcinosarcoma de Walker 256, el desacoblament observat entre la respiració i la fosforilació es posa de manifest a mesura que creix el tumor, i depèn alhora del grau de malignitat que té. En aquest estudi s'observa una disminució del quocient ADP/O, que podria ser reduït si els mitocondris hepàtics

fossin incubats en presència d'albúmina, proteïna que pot lligar àcids grassos i peròxids d'aquests.

Metabolisme nitrogenat en situacions tumorals

Metabolisme proteic en l'hoste

En l'hoste el balanç de nitrogen —síntesi i degradació proteica— es troba alterat ja que hi ha un flux de nitrogen des dels teixits normals als neoplàstics, que porta a un clar balanç nitrogenat negatiu (Kurzer i Meguid, 1986). Això col·loca l'hoste en una situació de clara malnutrició proteica que sense dubte contribueix al procés caquètic del pacient cancerós. A més, aquest procés no és només conseqüència d'una disminuïda ingesta o anorèxia, sinó que s'ha vist que hi ha un efecte directe o indirecte del tumor sobre el metabolisme proteic de l'hoste (Stein *et al.*, 1976; Currie i Currie, 1982; Kurzer i Meguid, 1986).

En experiments amb aminoàcids radioactius (Kawamura *et al.*, 1980; Landel *et al.*, 1985), s'ha vist que animals portadors de tumors de creixement ràpid presenten taxes fraccionals de síntesi més altes en fetge i taxes de degradació més altes i de síntesi més baixes en múscul esquelètic. A més, aquest fenomen s'observa abans que es produeixi una disminució en el balanç nitrogenat o en la ingesta (Buzby *et al.*, 1980; Norton *et al.*, 1981; Landel *et al.*, 1985). De fet, el tumor promou un augment de degradació proteica (Lundholm *et al.*, 1976; Lundholm *et al.*, 1979a) i una disminució de la síntesi (Goodlad i Clarck, 1972; Lundholm *et al.*, 1976; Lundholm *et al.*, 1979a) en els teixits de l'hoste. Encara que es podria pensar, a primera vista, que la demanda tumoral de nitrogen és responsable d'aquesta situació, sembla que el problema no és tan senzill. Lundholm *et al.* (1980) varen trobar que la incorporació de leucina- ^{14}C *in vivo* a proteïna muscular es troba

significativament reduïda i, alhora, la taxa fraccional de degradació proteica augmentada en pacients cancerosos. Demostraren, així mateix, activitats augmentades d'enzims lisosomals com catepsina D i β -glucuronidasa (Lundholm *et al.*, 1980). En canvi, estudis on es mesuraren diferències artèrio-venoses al nivell del braç d'individus cancerosos no indicaren una augmentada efluxió d'aminoàcids (Clarke *et al.*, 1978). Estudis més recents semblen revelar que la pèrdua de proteïna muscular és més aviat deguda a una disminuïda síntesi més que a una augmentada degradació de proteïnes musculars (Millward *et al.*, 1976). En aquest fenomen, hi podrien participar canvis hormonaals. Així, com hem assenyalat prèviament, la concentració de glucocorticoides augmenta en situacions tumorals, i aquest fet podria tenir relació amb l'augmentada degradació i la reduïda síntesi proteica. La determinació de 3-metilhistidina —aminoàcid característic de trencament de proteïnes miofibril·lars (Young i Munro, 1978)— en orina d'animals afectats per diferents tipus de tumors malignes revela que efectivament hi ha un procés degeneratiu creixent a nivell muscular. Com a resultat d'aquest es produeix un fort alliberament d'alanina i glutamina, aminoàcids que seran utilitzats tant pel fetge de l'hoste com pel mateix tumor per a l'atenció de les seves necessitats de creixement.

El tumor com a «trampa» de nitrogen

L'any 1951 Mider introduí aquest terme per indicar la facilitat que tenen els tumors per actuar com una «trampa» de nitrogen, on els aminoàcids són captats tant per a la seva oxidació com per a la incorporació a proteïnes. De fet, l'excés drenatge de determinats aminoàcids per part del tumor pot explicar en part la disminuïda taxa de síntesi proteica muscular (Lundholm *et al.*, 1976; Lundholm *et al.*, 1979a; Goodlad i Clarck, 1972).

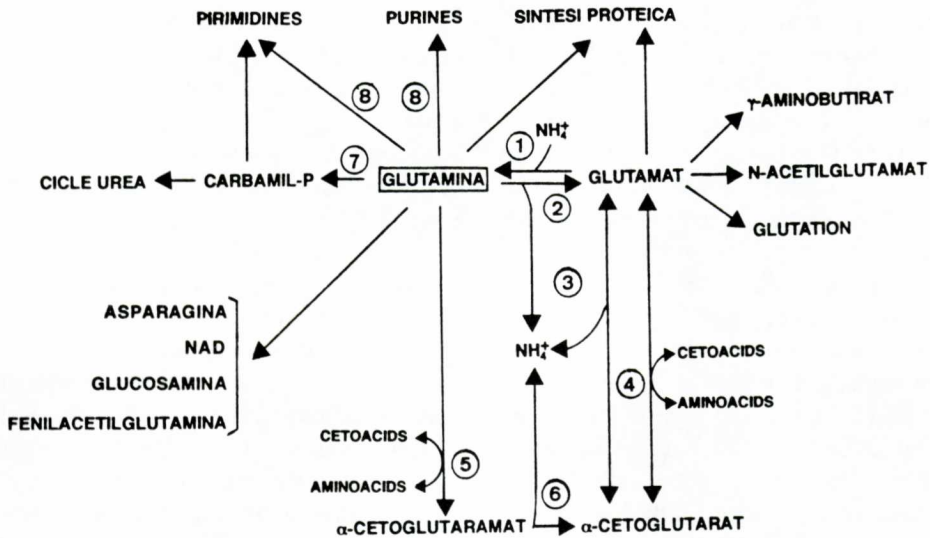


FIGURA 5. Les vies d'utilització de glutamina en la cèl·lula tumoral.

La glutamina pot ésser utilitzada pel tumor d'una manera anabòlica o catabòlica. Així, i mitjançant la carbamilfosfat sintetasa II, el seu esquelet pot ésser emprat per la síntesi de bases nitrogenades; també pot ésser incorporada a proteïna tissular. Tanmateix, pot ésser desaminada a glutamat i posteriorment convertida a través de transaminases o glutamat deshidrogenasa a 2-oxoglutarat —un intermediari del cicle de Krebs—, amb una finalitat clarament energètica. (1. Glutamina sintetasa; 2) Glutaminasa; 3) Glutamat deshidrogenasa; 4) Glutamat transaminases; 5) Glutamina transaminases; 6) Amidases; 7) Carbamil fosfat sintetases I i II; 8) Amidotransferases.)

La síntesi proteica tumoral és molt alta i s'accelera probablement com a conseqüència d'increments en l'activitat d'enzims que catalitzen la síntesi de purines i pirimidines (Snell, 1984; Snell, 1985; Snell i Weber, 1986). A la cèl·lula tumoral hi ha una redistribució de la maquinària sintètica (Goodlad i Clarck, 1972), de tal manera que es produeix una reducció de la població de ribosomes lligats a membrana —especialitzats en la síntesi de proteïnes de secreció, com ara hormones—, la qual cosa indica que hi ha una pèrdua de funció secretora

versus la de proliferació. A més, el tumor provoca també canvis en la maquinària sintetitzadora de proteïnes en altres tipus cel·lulars. Així, en molts casos es manifesta una clara hipoalbuminèmia que pot ésser conseqüència d'una disminuïda síntesi o una augmentada degradació de la proteïna (Shapot, 1979). També es pot observar el mateix fenomen amb d'altres proteïnes, com la transferrina, o determinades lipoproteïnes (Blackburn *et al.*, 1977). D'altra banda, i encara que hagin perdut parcialment la capacitat per a la síntesi de proteïnes de secreció,

determinats tumors secreten proteïnes —hormones en particular— que no eren normalment produïdes pel teixit on s'ha esdevingut la transformació. Alguns exemples són la producció d'ACTH ectòpic, hormona paratiroidal i hormona antidiürètica (Gospodarowicz i Moran, 1976; Todaro i Delarco, 1978; Odell i Wolfsen, 1980; Goustin *et al.*, 1986). També factors de creixement tumorals, els quals competeixen amb factors de creixement normals pel *binding* a receptors específics i, per tant, poden afectar les respostes metabòliques de les cèl·lules normals a aquests factors. Es pensa que aquest fenomen és, de fet, una transformació a un estat pluripotencial més primitiu (Levin i Gevers, 1981). Així, quan una cèl·lula es diferencia, hi ha repressió gènica associada a la seva especialització. La transformació neoplàstica actuaria desreprimint determinats gens i, per tant, generant noves

proteïnes que serien sintetitzades i alliberades.

Determinats aminoàcids són essencials pel creixement del tumor en certs casos. Així, l'asparagina és essencial per al creixement de determinats tumors (Shapot, 1979), i, fins i tot, s'ha utilitzat asparaginasa —l'enzim que trenca l'aminoàcid— com a estratègia terapèutica antitumoral. També la glutamina i, per a determinats tumors, isoleucina i valina (Wagle *et al.*, 1963).

El metabolisme de la serina es troba també alterat en teixits neoplàstics. Aquest aminoàcid té un paper molt important en el metabolisme cel·lular, atesa la seva implicació en la síntesi de fosfolípids i proteïna, i també en la gluconeogènesi i en la formació de pirimidines. Sauer *et al.* (1982) varen investigar l'extracció d'aminoàcids d'hepatomes transplantables *in vivo* i observaren una gran captació de l'esmentat aminoàcid. Estudis posteriors han demostrat que

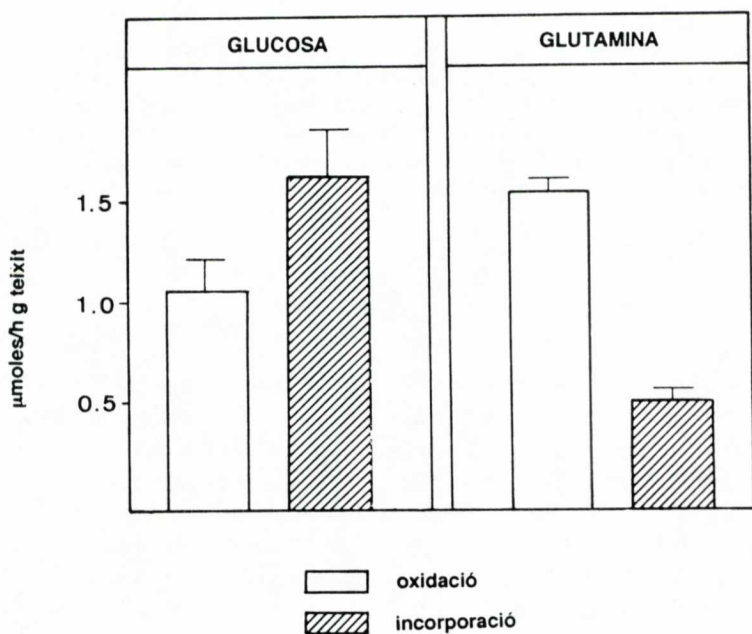


FIGURA. 6. Oxidació i incorporació de glucosa i glutamina en cèl·lules del carcinoma pulmonar de Lewis.

Adaptat de Rivera *et al.* (1988).

una de les característiques més interessants de l'estadi tumoral és la reorientació del metabolisme de la serina cap a una augmentada síntesi de bases nitrogenades, la qual facilita enormement les necessitats de replicació de la cèl·lula transformada.

Activitat glutaminàsica tumoral

Ja fa anys es va establir que tant els hepatomes de creixement ràpid com els tumors ascítics d'Ehrlich són capaços d'oxidar glutamina a través d'una glutaminasa, dependent de fosfat present en els mitocondris d'aquestes cèl·lules (Kovacevic i Morris, 1972; Sauer *et al.*, 1982; Quesada *et al.*, 1988; Medina i Núñez de Castro, 1990) (vegeu les figures 5 i 6). S'ha suggerit que la glutamina és un dels més importants precursors en la síntesi de proteïnes i de bases nitrogenades que té lloc en aquestes cèl·lules. La concentració de l'aminoàcid en l'interior cel·lular és, però, molt baixa, fruit de l'activa transformació i de la baixa activitat glutamina sintetasa (Rivera, 1985; Rivera *et al.*, 1988). De fet, s'ha descrit una important producció de glutamina en els teixits de l'hoste. En animals portadors del carcinoma de Lewis, la concentració circulat de l'aminoàcid és molt elevada i, alhora, la concentració tissular és molt baixa, la qual cosa suggereix un actiu alliberament de l'aminoàcid cap a la circulació. Observacions similars s'han fet en conills portadors del carcinoma Brown-Pierce (Shapot, 1979). Tanmateix, en cèl·lules humanes en cultiu la glutamina s'ha vist que és molt important tant per la seva incorporació a proteïnes com per la seva oxidació terminal (Zielke *et al.*, 1984) (vegeu la fig. 6).

Per tant, la glucosa i la glutamina poden ésser considerades com els principals compostos per atendre les necessitats energètiques de les cèl·lules tumorals. La glutamina és un dels aminoàcids circulants més abundants en la sang d'animals portadors de tumors i és principalment

alliberada pel múscul esquelètic. També és el combustible més important dels enteròcits (Windmueller i Spaeth, 1974), reticulòcits (Rapoport *et al.*, 1971) i oòcits (Bae i Foote, 1975), per la qual cosa no està fora de lloc considerar que és l'aminoàcid més important en el procés de proliferació cel·lular associat al creixement tumoral.

Càncer i metabolisme lipídic

Mobilització de greixos i metabolisme de lipoproteïnes en l'hoste

El paper dels lípids en el metabolisme de les cèl·lules tumorals de creixement ràpid no és tan clar com el de la glucosa o el dels aminoàcids. A pesar d'això, estudis duts a terme en humans i animals experimentals suggereixen que la mobilització de greixos que té lloc en l'hoste en processos invasius és molt important (vegeu la fig. 7) i explica la major part del pes corporal perdut en situacions de caquèxia (McAndrew, 1986). Aquesta mobilització de reserves grasses sembla directament relacionada amb la massa tumoral, i la seva progressiva dissolució contribueix tant al manteniment provisional de l'hoste com al desenvolupament tumoral. Durant molt temps s'ha pensat que aquest procés era activat per algun factor característic d'acció lipolítica alliberat pel mateix tumor. En aquest sentit, l'administració a ratolins de preparacions no viables de carcinoma de Krebs-2 produí una forta mobilització lipolítica (Costa i Holland, 1962). Ara bé, la natura d'aquest compost encara roman desconeguda. Nakahara i Fukuoka (1948) aïllaren de teixits tumorals un factor anomenat *toxohormona*, proteïna de 75.000 daltons. Aquest compost provoca depleció lipídica en l'hoste a la vegada que immunosupressió. Posteriorment, Masuno *et al.* (1984) aïllaren, tant a partir de ratolins portadors de sarcomes com en pacients amb hepatomes, l'anomenada *toxohormona-L*, la qual, en ésser administrada a animals també causà mobilització

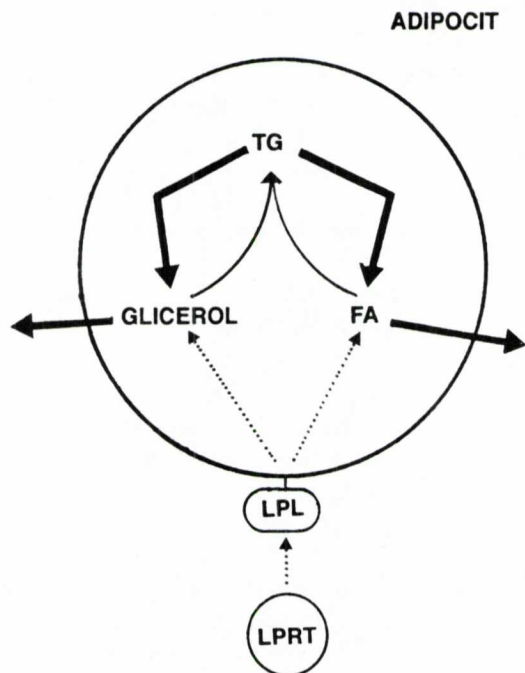


FIGURA 7. Flux lipolític generat en el teixit adipós de l'hoste com a conseqüència de la presència del tumor.

La presència de la massa tumoral provoca una marcada disminució de l'entrada de triglicèrids (TG) de lipoproteïnes (LPRT) al teixit com a conseqüència d'una disminuïda activitat lipoproteïna lipasa (LPL); tanmateix el tumor, de manera directa o indirecta, activa la lipòlisi fortament, fomentant d'aquesta manera una massiva sortida d'àcids grassos (FA) i, per tant, contribueix a la progressiva dissolució del teixit.

lipídica. També es purificà un factor lipolític de 5.000 daltons a partir del timus de ratolins portadors del limfoma AKR i de línies cel·lulars derivades d'aquest tumor (Kitada *et al.*, 1981). Avui en dia sabem que els factors lipolítics són compostos, alliberats principalment pel mateix hoste, anomenats citocines; més endavant analitzarem les seves característiques i funció durant el procés d'invasió tumoral.

La massiva mobilització lipídica (vegeu la fig.7) porta a una profunda hiperlipèmia (Frederick i Begg, 1954; Kralovic *et al.*, 1977; Evans i Williamson, 1988), amb elevats nivells de VLDL (lipoproteïnes de molt baixa densitat) —principals molècules transportadores de triglicèrids de síntesi endògena— i àcids grassos circulants (Mueller i Watkin, 1961; Argilés i

López-Soriano, 1991b). Aquesta resposta metabòlica és conseqüència parcial de l'intens drenatge de glucosa per part del tumor, el qual col·loca a l'hoste en un ambient hipoglucèmic i, per tant, activa la maquinària metabòlica responsable de la mobilització lipolítica i alhora, força els teixits de l'hoste al canvi de substrat energètic, que passa de glucosa a àcids grassos. Aquest fet, a més, és potenciat per l'ambient hormonal generat. Així, la disminuïda secreció insulínica i la resistència a l'hormona activa encara més el procés lipolític —la insulina es considera un dels principals factors antilipolítics— i redueix l'activitat lipoproteïna lipasa en el teixit adipós, i contribueix així a l'hipertrigliceridèmia. Tanmateix, la sobreproducció de glucocorticoides contribueix a la situació

esmentada, atès el marcat caràcter antiinsulínic d'aquestes hormones. Els alts nivells d'àcids grassos circulants i la seva utilització a nivell hepàtic porta a una augmentada producció de cossos cetònics, la qual cosa comporta elevats nivells circulants d'aquests compostos (Rofe *et al.*, 1986).

De fet, la demanda hepàtica d'àcids grassos sorgeix com a conseqüència de l'activació gluconeogènica anteriorment esmentada. El procés de síntesi de glucosa és dependent d'energia, i l'ATP requerit és generat mitjançant l'oxidació mitocondrial dels àcids grassos. Aquest fet permet, doncs, comprendre parcialment la depleció lipídica associada a processos cancerosos (Levin i Gevers, 1981). Tanmateix, l'elevat recanvi de glicerol present en pacients afectats per diferents tipus de tumors (Eden *et al.*, 1984) abona aquest plantejament. Aquesta molècula és alliberada com a conseqüència de la mobilització de greixos del teixit adipós i pot ésser utilitzat a nivell hepàtic com a substrat gluconeogènic gràcies a la seva activació per la gliceroquinasa i oxidació posterior mitjançant l'acció de l' α -glicerolfosfat deshidrogenasa a dihidroxiacetona fosfat, un intermediari de la via gluconeogènica.

Existeix una gran similitud metabòlica entre el que trobem en animals afectats per tumors malignes i en animals durant la gestació. Així, el fetus actua com una «trampa» metabòlica per a la glucosa (James *et al.*, 1972; Palacín *et al.*, 1985) i aminoàcids (Reynolds i Young, 1971; Young, 1981), d'una manera similar a l'esmentat anteriorment pel tumor. Això es afavorit pel fet que aquests compostos fàcilment travessen la placenta, en part com a conseqüència del gradient de concentració establert entre la circulació materna i la fetal (Battaglia i Meschia, 1978). De fet, el fetus ha estat sempre considerat com un «paràsit» que actua drenant contínuament substrats metabòlics de l'hoste, en aquest cas, la mare (Herrera, 1986). També hi ha una important tendència hipoglucèmica associada amb resistència a la insulina (Knopp *et al.*, 1970), hiperlipèmia (Argilés i Herrera, 1981; Ramírez

et al., 1983; Argilés i Herrera, 1989) i alts nivells de cossos cetònics circulants (López-Soriano i Argilés, 1985; López-Soriano i Argilés, 1986; Argilés, 1986a; Argilés, 1986b; Peinado *et al.*, 1986).

Metabolisme lipídic a la cèl·lula tumoral

El concepte que el tumor actua com una «trampa» metabòlica per a la glucosa i els aminoàcids pot ésser també ampliat als àcids grassos que el tumor pot utilitzar per a les seves necessitats metabòliques. La utilització d'aquests compostos es refereix tant a processos de síntesi com de degradació. Els àcids grassos poden ser captats pel tumor en forma de complexos lligats a albúmina o bé en forma de lipoproteïnes. Així, els nivells d'activitat lipoproteïna lipasa, l'enzim responsable del metabolisme de les lipoproteïnes riques en triglicèrids, en ratolins portadors d'un tumor no metastatitzador (ESR 586) (Thomson i Koons, 1981), foren alts en comparació amb els detectats en el teixit adipós. L'activitat d'aquest enzim explica l'entrada d'àcids grassos a l'interior de la cèl·lula tumoral, que augmenta, per tant, la disponibilitat d'aquests substrats. De tota manera, estudis duts a terme en cèl·lules ascítics d'Ehrlich demostren que la pràctica totalitat dels àcids grassos presents en aquestes cèl·lules deriven de síntesi *de novo*. Això implica que, almenys en alguns tumors, la lipogènesi és un procés molt important per a la cèl·lula transformada, tant important com qualsevulla altra font d'àcids grassos de l'hoste (Cederbaum i Rubin, 1976; Ookhtens *et al.*, 1984).

Encara que els àcids grassos són utilitzats predominantment per a la seva oxidació, amb una clara finalitat energètica, són també emprats en la síntesi de colesterol i fosfolípids. En les cèl·lules d'hepatomes hi ha defectes en el control de la síntesi de colesterol, de manera que aquest procés no és modulats per l'entrada de colesterol procedent de la dieta, com a conseqüència d'una manca de retroinhibició sobre la hidroximetil-glutaril-CoA reductasa

(Feo *et al.*, 1973). Això es correlaciona amb els alts nivells de colesterol present en aquestes cèl·lules, particularment en els mitocondris (Pedersen, 1978). També s'ha vist en molts tipus de tumors malignes que afecten animals experimentals que existeix una gran capacitat per l'assimilació de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) molt riques en colesterol (Lombardi *et al.*, 1989). Sembla, doncs, probable que part de les alteracions anteriorment comentades, que afectaven la funció mitocondrial, poden ésser conseqüència d'una alterada composició lipídica de la membrana mitocondrial.

Les cèl·lules més dependents de lípids són aquelles corresponents a tumors de lent creixement, les quals contenen poca activitat hexoquinàsica i, per tant, utilitzen poc la glucosa com a substrat energètic. D'aquesta manera, els tumors ben diferenciats probablement depenguin més d'ATP mitocondrial que glucolític per atendre les necessitats energètiques de la massa proliferant. Contràriament, els tumors de ràpid creixement no utilitzen àcids grassos com a principal font energètica (Weinhouse *et al.*, 1973; Pedersen, 1978). L'activitat de l'enzim aciltioquinasa —enzim activador d'àcids grassos— és reduït almenys un 85 % en aquest tipus de tumors (Weinhouse *et al.*, 1973). Subsegüentment, les necessitats energètiques d'aquest tipus de cèl·lules es resolen preferentment mitjançant l'oxidació de glucosa i aminoàcids.

Paper dels cossos cetònics

Els cossos cetònics (acetoacetat i β -hidroxibutirat) són produïts a nivell hepàtic en paral·lel amb altes taxes d'oxidació d'àcids grassos en situacions com el dejuni o la diabetis (Miles *et al.*, 1980). Proporcionen un combustible alternatiu a la glucosa i alhora, inhibeixen la seva oxidació i la depleció lipídica i proteica (Robinson i Williamson, 1980).

Hi ha poca informació sobre la utilització

d'aquests substrats metabòlics per les cèl·lules tumorals. Hi ha diferents treballs que descriuen cetonèmia en animals portadors de tumors (Mueller i Watkin, 1961; Wagle *et al.*, 1963). Fenselau *et al.* (1975) trobaren que els hepatomes de creixement ràpid utilitzen activament acetoacetat. Els mitocondris d'aquest tipus de cèl·lula contenen l'enzim succinil-CoA: acetoacetyl-CoA transferasa, que facilita la conversió de l'acetoacetat en acetoacetyl-CoA, compost que posteriorment pot ésser trencat en dues molècules d'acetyl-CoA. També s'ha trobat activitat β -hidroxibutirat deshidrogenasa en hepatomes de Morris (Ohe *et al.*, 1967). Sauer i Dauchy (1983), utilitzant precisament un d'aquests tumors i mesurant diferències arterio-venoses, trobaren una activa utilització de cossos cetònics pel tumor en animals dejunats. Contràriament, en un carcinoma mamari de rata, Mueller i Watkin (1961) mostraren que el tumor tenia poca capacitat per al metabolisme dels cossos cetònics. En el mateix estudi, però, es descriu un estat hipercetonèmic en l'hoste amb un augment del recanvi de cossos cetònics i una disminució del de la glucosa.

Pot ser que aquest estat d'hipercetonèmia constitueixi un avantatge per a l'hoste, donada la seva influència evitant l'excessiva oxidació d'aminoàcids de cadena ramificada. Futures investigacions sobre el particular resultarien potencialment molt interessants en constituir aquests aminoàcids importants senyals metabòlics.

LES CITOCINES COM A MEDIADORES DE LA RESPOSTA DE L'HOSTE

Durant molt de temps es pensà que els canvis metabòlics que apareixen en l'hoste eren conseqüència de l'alliberament de compostos produïts pel mateix tumor. Avui sabem que és el mateix hoste el que allibera compostos que semblen estar implicats directament en els canvis esmentats. Les citocines són polipèptids sintetitzats i alliberats per monòcits i macròfags tissulars com a resposta d'estímul invasius, les

quals generen una important sèrie de canvis metabòlics (Argilés i López-Soriano, 1989a; Evans *et al.*, 1989; Arbós *et al.*, 1992; Argilés *et al.*, 1992; García Martínez *et al.*, 1992) (vegeu la fig. 8). Aquests canvis tenen una relació estreta amb el desgast tissular i, per tant, estan directament implicades en el procés caquètic. Els dos tipus de citocines que han rebut més atenció són la interleucina 1 (IL-1) i el factor necròtic tumoral- α (TNF). Ambdós constitueixen mecanismes de defensa per afrontar a

l'estímul invasiu (agent patògen, tumor); així, el TNF és capaç d'induir necrosi hemorràgica en determinats tipus de tumors i és, a més, citotòxic per a cèl·lules tumorals. A pesar d'això, l'alliberament d'aquests compostos col·loca l'hoste en una situació metabòlica força complicada, com veurem tot seguit.

Hi ha importants evidències experimentals que apunten al fet que les citocines participen en l'elevada lipòlisi que s'esdevé en el teixit adipós en situacions de creixement tumoral, i també en

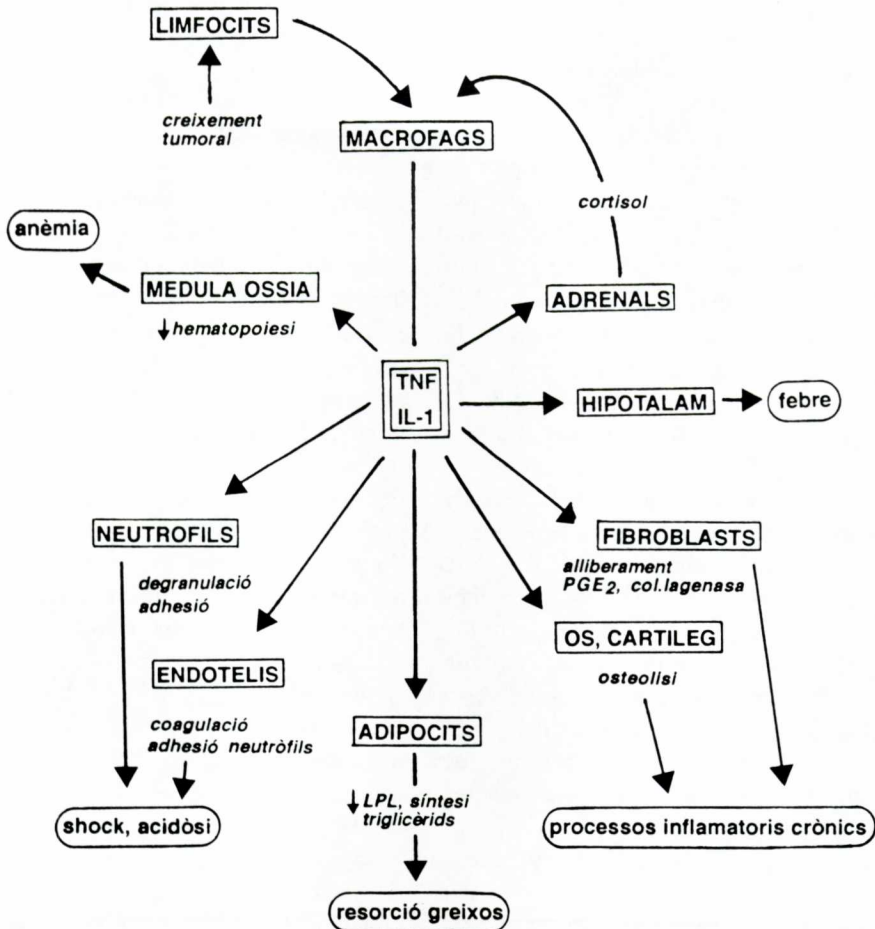


FIGURA 8. *Efectes metabòlics induïts per les citocines a diferents òrgans.*

Adaptat de Argilés i López-Soriano (1989a).

la pèrdua de massa muscular i proteïnes d'aquest teixit que també trobem en aquest tipus de situació patològica. En aquest sentit, s'ha pogut demostrar que el TNF és capaç d'inhibir l'activitat lipoproteïna lipasa del teixit adipós tant *in vivo* (Semb *et al.*, 1987; Argilés *et al.*, 1989a) com *in vitro* (Kawakami *et al.*, 1987). Aquest fet repercuteix en una menor captació de triglicèrids associats a lipoproteïnes per part del teixit; així mateix, la citocina augmenta la taxa lipolítica en adipòcits. El resultat és que el teixit, a més de captar menys lípids, en degrada més, amb la conseqüent progressiva dissolució d'aquest. Aquest fet porta a una situació de clara hiperlipèmia en l'animal, també típica de l'estat cancerós (Frederick i Begg, 1954; Mueller i Watkin, 1961; Kralovic *et al.*, 1977; Evans i Williamson, 1988; Argilés i López-Soriano, 1991b).

Pel que fa al desgast muscular, s'ha vist que el tractament crònic amb IL-1 o TNF produeix una important pèrdua de proteïna muscular, amb disminucions paral·leles de nivells de mRNA per proteïnes miofibril·lars com l'actina i la miosina (Fong *et al.*, 1989). Estudis on s'ha mesurat la taxa de recanvi proteic muscular amb infusió de leucina- 14 C (Flores *et al.*, 1989), han demostrat que l'administració crònica de TNF porta a un important augment de la taxa de degradació proteica, i aquest efecte és potenciat per l'administració simultània d'IL-1. Sembla, a més, que l'administració de TNF o IL-1 a rates provoca un important augment de l'activitat deshidrogenasa d'aminoàcids de cadena ramificada. Darrerament el nostre grup de recerca ha trobat que, en rates portadores del carcinosarcoma de Walker 256 —un tumor de creixement ràpid—, aquest enzim presenta una elevada activitat en múscul esquelètic (Argilés i López-Soriano, 1991c) (vegeu la fig. 9), que, a més, té una estreta relació amb la capacitat per l'oxidació d'aquest tipus d'aminoàcid en el teixit (Argilés i López-Soriano, 1989b; Argilés i López-Soriano 1990c). Es, doncs, força interessant que les citocines provoquin en el múscul esquelètic situacions metabòliques estretament

comparables a aquelles que s'esdevenen en animals portadors de tumors (Llovera *et al.*, 1992) (vegeu la fig. 10).

L'acció del TNF sobre la pèrdua de proteïna muscular sembla lligada a la d'altres hormones com els glucocorticoides. En aquest sentit, la concentració d'aquest tipus d'hormona és molt alta en situacions tumorals (Argilés *et al.*, 1989b) i després de l'administració de citocines (Argilés *et al.*, 1989b) per la qual cosa cal pensar en una acció sinèrgica sobre el teixit muscular. En aquest sentit, els glucocorticoides augmenten la taxa de degradació proteica a nivell muscular, i de fet, l'acció de les citocines podria estar totalment lligada a l'augment de glucocorticoides circulants. Aquest punt, però, encara no ha estat completament esbrinat.

Una de les més importants adaptacions metabòliques relacionades amb el metabolisme dels aminoàcids que s'esdevé en situacions de malignitat és un important augment de la captació hepàtica d'aquests compostos (Argilés i López-Soriano, 1989c; Argilés i López-Soriano, 1990d) (vegeu les figures 11 i 12), i també de la síntesi proteica hepàtica. Davant la invasió tumoral, el fetge sintetitza i allibera proteïnes *de fase aguda* (característiques també de la infecció i el trauma físic). S'ha vist que aquests efectes són perfectament mimetitzables per citocines. Així, l'administració de TNF a rates provoca un augment de la captació hepàtica de α -aminoisobutirat —un anàleg estructural de l'alanina— (Argilés *et al.*, 1989b), acció sinèrgica de l'alliberament de glucagó induït per la citocina (Warren *et al.*, 1988). Tanmateix, el tractament crònic amb TNF induïx un augment de la taxa de síntesi proteica hepàtica (Llovera *et al.*, 1992).

Sembla, doncs, evident que gran part de les adaptacions metabòliques associades amb el creixement tumoral poden ésser explicades de manera directa o indirecta per la presència de les citocines, compostos alliberats pel mateix hoste —que no pel tumor— per fer front a la invasió tumoral.

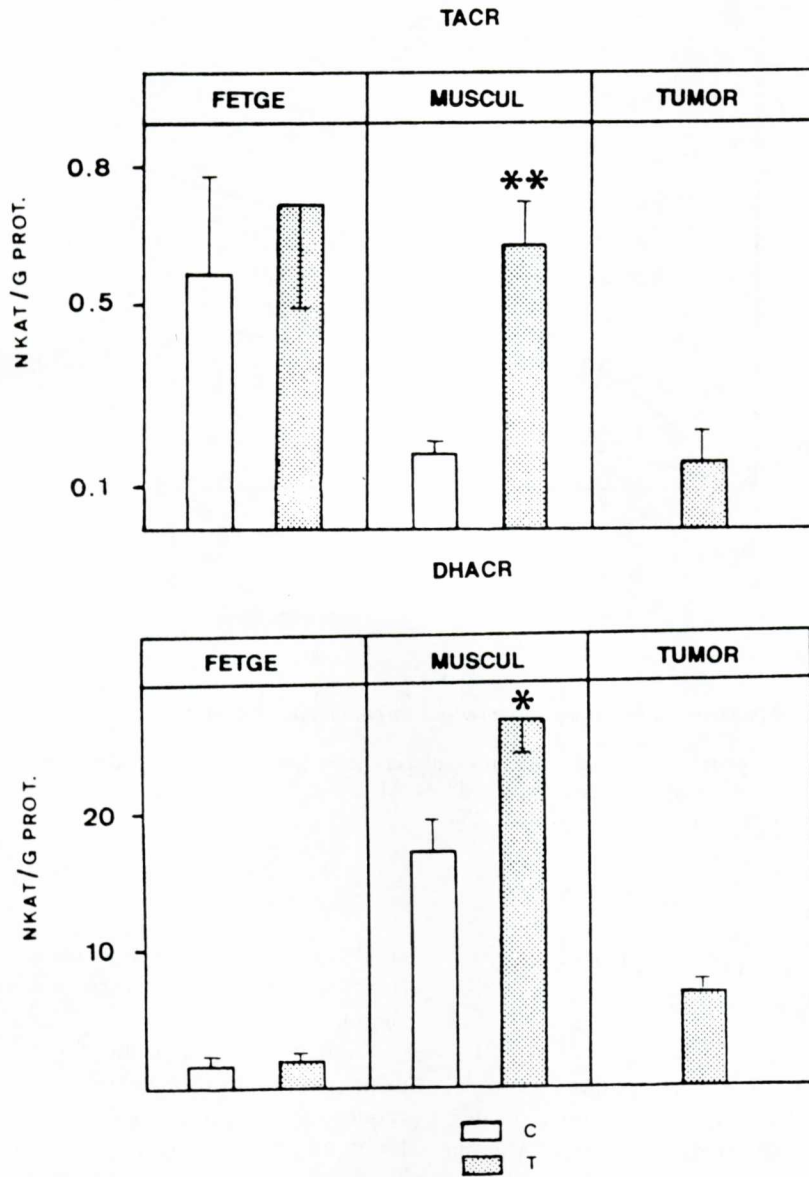


FIGURA 9. *Activitats enzimàtiques relacionades amb el catabolisme dels aminoàcids de cadena ramificada.*

Transaminasa (TACR) i deshidrogenasa (DHACR) d'aminoàcids de cadena ramificada en animals portadors del carcinoma de Walker 256. Adaptat d'Argilés i López-Soriano (1991c).

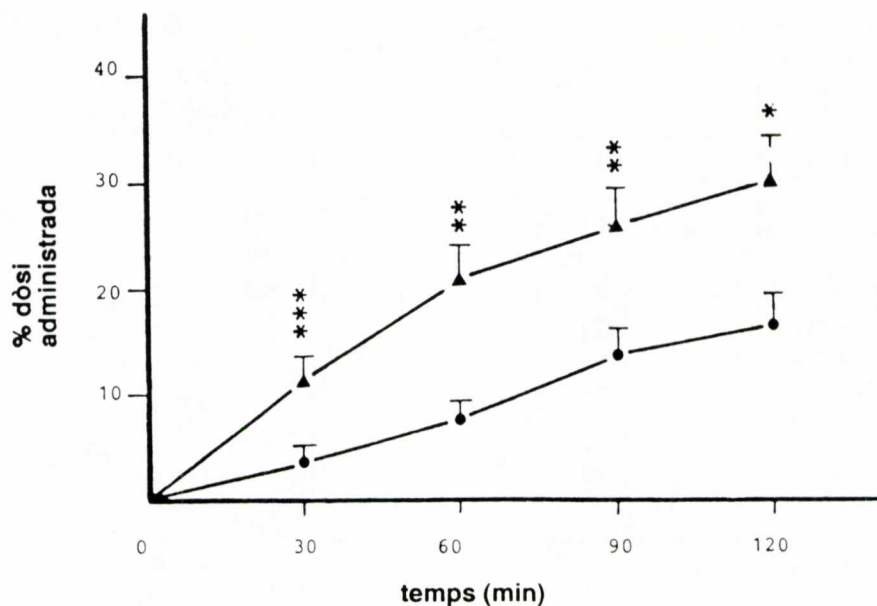


FIGURA 10. *Oxidació de leucina en rates portadores del carcinoma de Walker 256.*

Producció de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -leucina administrada per via intravenosa a rates portadores d'un tumor de creixement ràpid. Les dades són expressades en % de la dosi administrada. ● — ● controls, ▲ — ▲ portadors de tumor. Adaptat de Argilés i López-Soriano (1990c).

EL TNF I LA CAQUÈXIA CANCEROSA

Freqüentment el creixement tumoral s'acompanya d'una marcada pèrdua de pes, anorèxia, debilitat, anèmia i astènia. Aquesta síndrome es coneix amb el nom de *caquèxia*, i pot afectar entre un 16 i un 73 % dels pacients cancerosos (Warren, 1932). En aquests pacients, fins la nutrició parenteral total —per evitar l'anorèxia— no aconsegueix minvar els símptomes de l'estat caquètic, per la qual cosa es pot deduir que la despesa metabòlica que deu

condicionar aquest estat no pot ésser simplement fruit de la demanda tumoral (Nixon *et al.*, 1980; Brennan, 1981).

Com hem comentat anteriorment, els dos principals processos metabòlics lligats a l'estat caquètic són la mobilització de greixos del teixit adipós i l'alliberament d'aminoàcids procedents de proteïnes musculars (Argilés i Azcón-Bieto, 1988). Ambdós són essencialment induïts per factors humorals —i no directament per part de la massa tumoral— en particular pel TNF. És per això que s'ha intentat associar aquesta citocina amb la pèrdua efectiva de pes, i s'han obtingut resultats contradictoris. Així,

l'administració repetitiva de TNF a animals de laboratori no provoca més que una inicial pèrdua de pes de caràcter transitori, a partir de la qual els animals tractats amb la citocina continuen guanyant pes com els controls (Mahony i Tisdale, 1988; Mahony *et al.*, 1988; Stovroff *et al.*, 1988; Bodnar *et al.*, 1989; Mahony i Tisdale, 1989); aquest fet pot ésser explicat si tenim en compte el caràcter fisiològic d'una administració repetitiva intraperitoneal o intravenosa i la curta vida mitjana de la citocina en la sang de l'animal tractat (Beutler i Cerami, 1988). És per això que Oliff *et al.* (1987) varen dissenyar un model d'administració basat en la injecció a ratolins immunodeprimits de cèl·lules «CHO» productores de TNF d'una manera constant. Aquestes

cèl·lules eren transfectades amb un vector d'expressió que contenia el gen del factor necròtic tumoral humà. En aquestes condicions, els animals tractats patien uns símptomes clarament caquètics en un 80 % dels casos. Tanmateix, la utilització d'anticossos contra TNF aconseguí revertir parcialment la síndrome caquètica en ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis, sense que es manifestin efectes sobre el desenvolupament de l'anèmia o la hipoalbuminèmia que sol acompanyar els estats cancerosos (Sherry *et al.*, 1989). Per tot això es pot concloure que certament el TNF és directament implicat en la síndrome de la caquèxia, fet que pot ésser utilitzat en un futur en el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques contra el càncer.

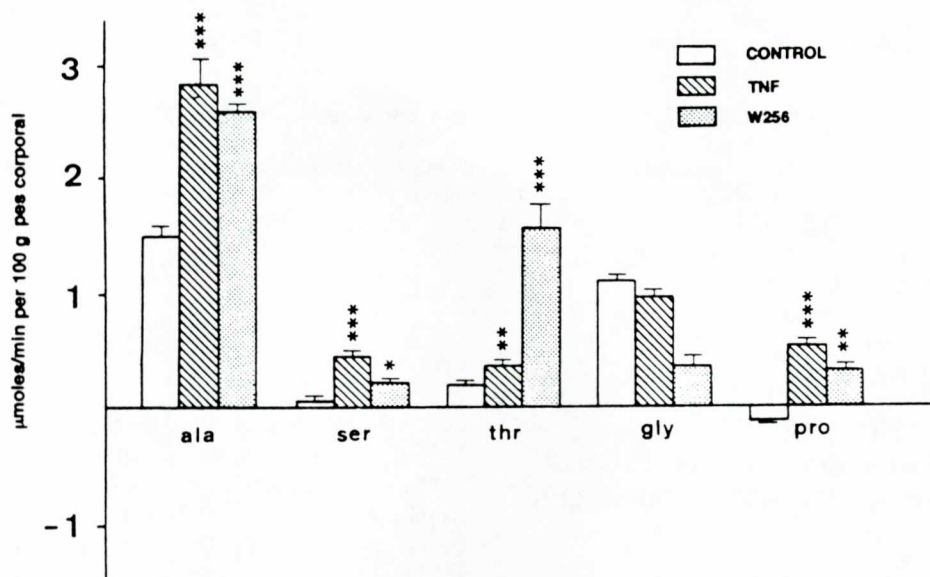


FIGURA 11. Efectes del TNF i el creixement tumoral sobre el balanç hepàtic d'aminoàcids.

Captació (+) o alliberament (-) hepàtics d'aminoàcids transportats pel sistema A en rates portadores del carcinoma de Walker 256 o tractades amb una dosi aguda de 20 μg de TNF. Adaptat d'Argilés i López-Soriano (1990d).

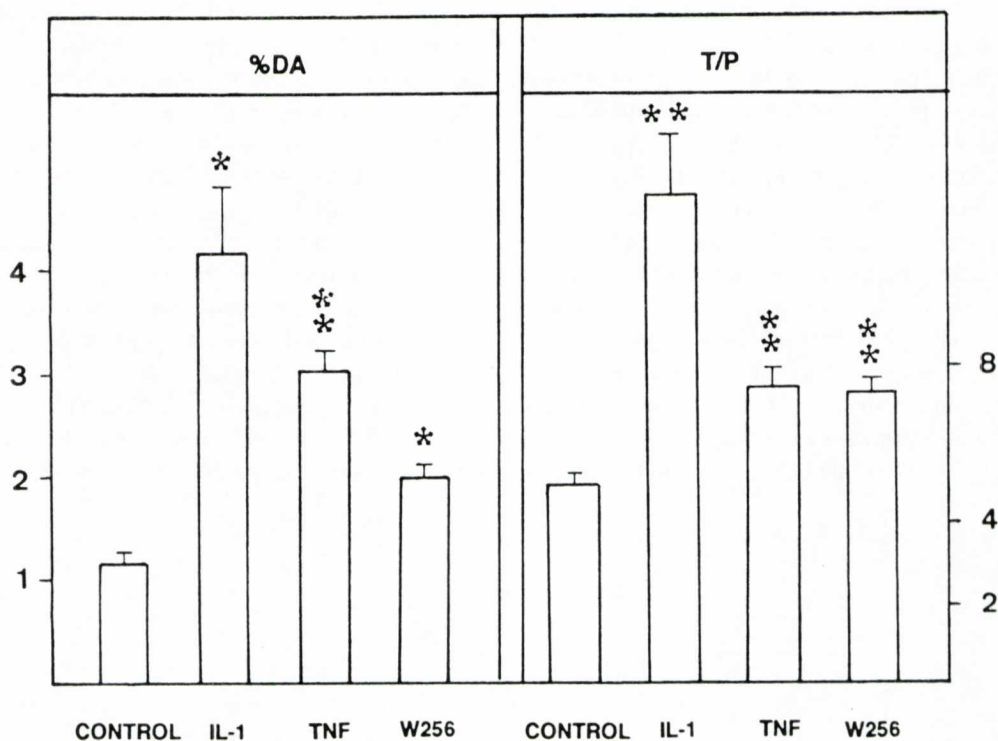


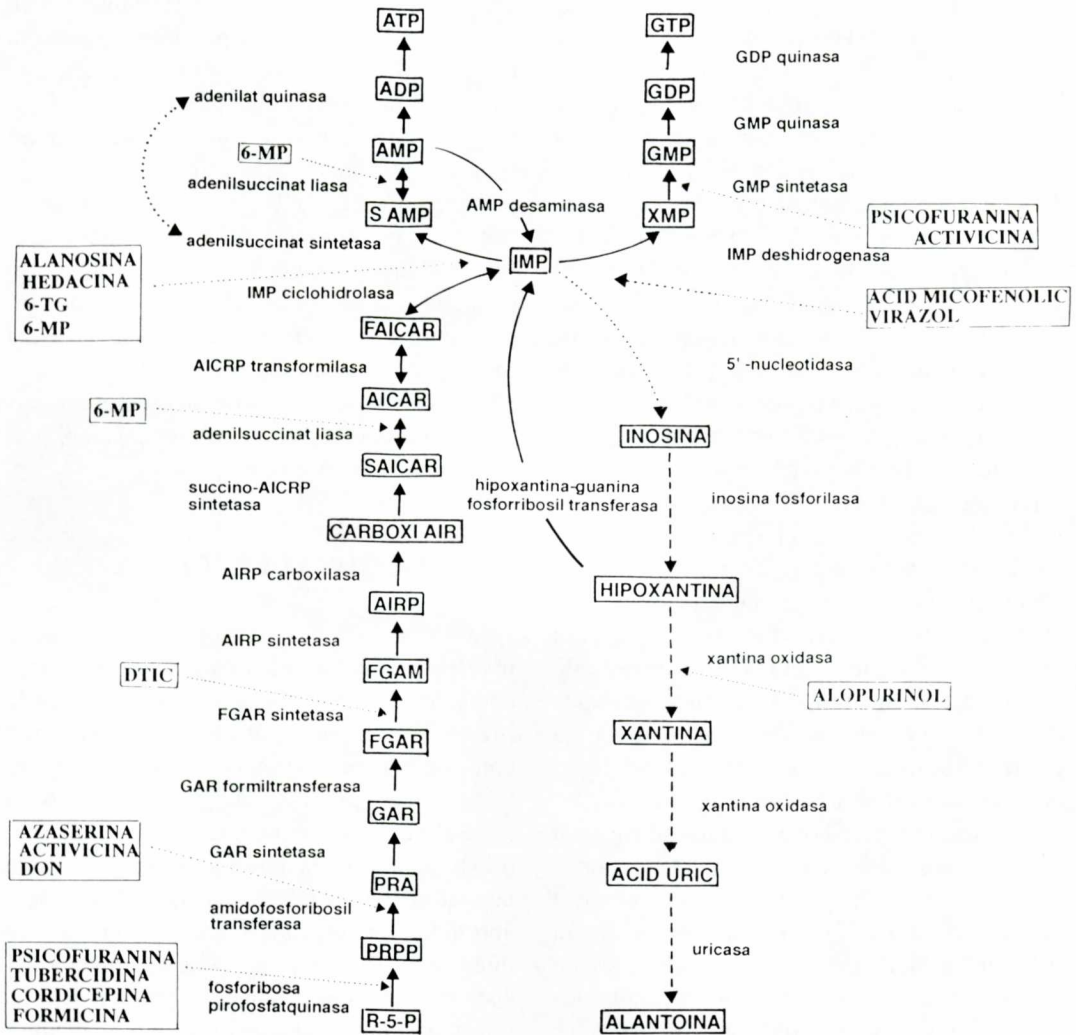
FIGURA 12. *Efectes de les citocines i el creixement tumoral sobre la captació hepàtica d'aminoàcids.*

Acumulació hepàtica d' α -aminoisobutirat en rates tractades amb dosis agudes d'interleucina-1 (IL-1) o factor necròtic tumoral (TNF) o afectades pel creixement del carcinoma de Walker 256. Els resultats s'expressen en % de la dosi absorbida (% DA) i com a relació teixit/plasma (T/P). Adaptat d'Argilés *et al.* (1989b).

EL CONEIXEMENT DE LES INTERACCIONS HOSTE-TUMOR I EL DISSENY D'ANTITUMORALS

Les principals estratègies terapèutiques per afrontar l'aparició d'un tumor s'han basat quasi exclusivament en l'anihilació directa de la cèl·lula tumoral sense tenir en compte els canvis metabòlics que s'esdevenen en l'hoste com a conseqüència de la invasió tumoral. En aquest

sentit, els antitumorals basen la seva acció en el fet de la gran capacitat proliferativa de les cèl·lules transformades i interfereixen en el procés de síntesi de bases nitrogenades i, conseqüentment, d'àcids nucleics (vegeu la fig.13). Tota una sèrie de compostos han estat emprats en el bloqueig de la síntesi de pirimidines i purines (vegeu la fig. 13). L'inconvenient d'aquest tipus d'antitumoral és que també incideix sobre d'altres tipus de cèl·lules normals de l'hoste però amb una alta taxa replicativa,

FIGURA 13. *Mecanisme d'acció de diferents antitumorals.*

La major part dels antitumorals tenen com a principal funció aturar la síntesi normal de bases nitrogenades i, per tant, d'àcids nucleics en la cèl·lula tumoral. En aquest esquema es representa la via de síntesi de purines i els llocs de bloqueig per inhibició enzimàtica dels passos clau en aquest procés: 6-MP = 6-mercaptopurina; SAMP = adenil succinat; 6-TG = 6-tioguanina; FAICAR = ribonucleòtid de formilaminoimidazolcarboximida; AICRP = amidoimidazolcarboximida ribosilfosfat; AICAR = ribonucleòtid de imidoamidazolcarboximida; AIR = ribonucleòtid d'aminoimidazol; AIRP = ribonucleòtid fosfat d'amidoimidazol; FGAM = ribonucleòtid de formilglicinamida; DTIC = dimetiltriatriazenimidazolcarboxamida; FGAR = amidoribonucleòtid de formilglicina; MTX = metotrexat; GAR = aminoribonucleòtid de glicina; PRA = fosforribosilamina; DON = diazooxonorleucina; PRPP = fosforribosilpirofosfat; R-5-P = ribosa-5-fosfat.

com els enteròcits o les cèl·lules de la pell. A més, molts d'aquests compostos poden interferir en alguns dels processos metabòlics esdevinguts en l'hoste com a conseqüència de la invasió, destinats, en principi, a contenir la invasió. Les alteracions metabòliques lligades a l'aparició d'un tumor poden ésser la base del disseny d'antitumorals amb la base de «dejunar» el tumor i «alimentar» les cèl·lules sanes. En aquest sentit, ja Buzby *et al.* (1980) varen assenyalar que era possible reduir el creixement tumoral donant a l'hoste principalment greixos com a base nutricional, atesa la baixa capacitat dels tumors malignes per utilitzar lípids com a substrats energètics. També s'han utilitzat inhibidors de l'enzim fosfoenolpiruvat carboxiquinasa —enzim clau en la via de síntesi de la glucosa—, com el sulfat d'hidrazina, combinats amb nutrició parenteral. Així mateix, s'ha utilitzat l'asparaginasa com a antitumoral, atesa la dependència que alguns tumors manifesten respecte a l'amida de l'àcid aspàrtic (Holland i Onhuma, 1979). Un altre tipus d'enfocament antitumoral consisteix en la utilització de tècniques immunofarmacològiques de gran especificitat. D'aquesta manera, les estratègies antitumorals més actuals es dirigeixen cap a l'anihilació més dirigida de cèl·lules canceroses; així, s'han utilitzat citocines com la interleucina-2 (IL-2) i el TNF per lluitar contra determinats tipus de neoplàsia. L'IL-2 és un factor proliferatiu de limfòcits T citotòxics (alguns molt específics contra determinats tipus de tumors) i, administrada amb un determinat tipus de limfòcits (cèl·lules LAK o assassines), ha demostrat que és de gran utilitat en el tractament de determinats tipus de càncer en humans. El TNF és un potent agent citotòxic específic de cèl·lules tumorals (Carswell *et al.*, 1975) i, alhora, es capaç d'induir necrosi hemorràgica en determinats tumors (Beutler i Cerami, 1986). Com a conseqüència de la introducció d'aquest tipus de teràpia, s'ha produït un gran desenvolupament de la immunoteràpia en el tractament del càncer en humans. A pesar

d'això, i com s'ha comentat anteriorment, les profundes alteracions que el tractament amb compostos immunoactius pot desencadenar en el pacient fan que haguem de limitar el seu ús fins aconseguir un millor coneixement de la resposta metabòlica de l'hoste envers aquest tipus de tractament. Fins i tot, i atesa l'activa participació del TNF en la inducció de la caquèxia, cal pensar a bloquejar parcialment l'acció d'aquest compost—almenys en el múscul esquelètic i el teixit adipós— mitjançant anticossos monoclonals o antagonistes del seu receptor en aquests teixits; en aquest sentit, la futura recerca en el camp dels antitumorals d'acció immunològica es troba en una fase preliminar, si bé molt esperançadora.

CONCLUSIONS I FUTUR

Malgrat que una part molt important de les investigacions biomèdiques s'han dirigit a combatre el càncer, el nostre coneixement de la interacció entre el tumor i l'hoste que competeixen per nutrients i factors tròfics es troba encara en fase de recerca. Això és parcialment conseqüència de la dificultat d'extrapolar estudis duts a terme en animals de laboratori a humans. El present treball ha intentat aprofundir en un millor coneixement de les interaccions bioquímiques que es donen en el sistema hoste-tumor, tant des d'un punt de vista molecular com fisiològic. Els canvis metabòlics condicionen el «nou» fenotip de la cèl·lula que s'ha transformat, el qual es caracteritza perquè presenta algunes de les característiques de la cèl·lula original abans de la seva transformació, quan es trobava en un estat molt menys diferenciat. En certa manera, la transformació tumoral significa, doncs, per a una cèl·lula una regressió a un estat ancestral totipotent.

La cèl·lula tumoral manifesta un metabolisme molt característic. Actua com una «trampa» metabòlica per als nutrients i impedeix així, la normal utilització d'aquests per l'hoste. Depenent

del tipus de creixement tumoral, les cèl·lules canceroses utilitzen glucosa, aminoàcids o bé àcids grassos per atendre les seves necessitats energètiques. D'altra banda, aquestes cèl·lules alliberen compostos a la circulació de l'hoste que no són normalment produïts per les cèl·lules normals originàries del tumor.

Alguns d'aquests compostos repercuteixen molt negativament en l'hoste en afectar algunes de les respostes metabòliques que permeten mantenir l'equilibri homeostàtic. El resultat final és que la maquinària metabòlica d'aquestes cèl·lules els permet de créixer contínuament d'una manera incontrolada.

Les conseqüències de la invasió tumoral sobre el metabolisme de l'hoste són variades. Tenen, però, una cosa comuna: la reducció de l'eficiència energètica de l'hoste. Depleció de lípids del teixit adipós, de proteïnes musculars, elevada gluconeogènesi, desacoblament entre la respiració i la fosforilació oxidativa constitueixen els principals components de la resposta metabòlica de l'hoste a la invasió tumoral. Aquests processos estan relacionats amb cicles fútils i, per tant, dissipadors d'energia. El resultat net és un desequilibri energètic que normalment col·loca l'hoste en un estat termodinàmic molt allunyat de l'equilibri (gran demanda de substrats per part del tumor i augment de l'entropia de l'hoste, fins i tot l'entropia de les molècules d'aigua és elevada en individus portadors de tumors), cosa que el fa extraordinàriament ineficient des d'un punt de vista termodinàmic. Aquesta ineficiència porta a l'aparició de la caquèxia —pèrdua massiva de pes en l'hoste— que acompanya el creixement tumoral i que és la causa directa d'un 40 % de les morts dels pacients cancerosos. Encara que en principi es pensà que era el mateix tumor el que induïa aquests canvis metabòlics que porten a l'estat caquètic, avui en dia sabem que és el mateix hoste el que sintetitza els mediadors d'aquest estat. Són, doncs, les cèl·lules del sistema immunitari de l'hoste les que alliberen les anomenades *citocines*, entre elles el factor necròtic tumoral

(TNF), amb una clara finalitat d'afrontar l'estímul invasor, i destruir, per tant, el tumor. Això sí, la seva actuació pot tenir i té conseqüències dramàtiques per a l'hoste, que el poden portar a la mort lligada a la caquèxia generada. Encara que sembli un xic insòlit aquest comportament defensiu, tenim un precedent històric, quan els grecs entraren a Teutrània, Aquil·les ferí Tèlef —rey de Mísia—; aquest, espantat perquè la ferida no curava, anà a Delfos a consultar l'oracle, el qual li va dir: «frotat amb el ferral de l'espasa d'Aquil·les perquè el que t'ha ferit et curarà». I així succeí; és, doncs, un cas històric que té un cert paral·lelisme amb el problema dels dobles efectes de les citocines sobre l'agent invasor i sobre l'hoste. Per tot l'exposat anteriorment, és molt important no sols el disseny d'estratègies terapèutiques basades en les característiques bioquímiques de les cèl·lules tumorals, sinó el d'aproximacions que tinguin en compte la resposta metabòlica generada en l'hoste com a conseqüència del procés invasiu i els mediadors d'aquesta. El futur, per tant, de la lluita contra el càncer és basarà en un millor coneixement dels processos anteriorment al·ludits, els quals permetran dissenyar pautes terapèutiques basades en combinacions de tractaments per fer cara a les cèl·lules tumorals i, alhora, per minvar la part negativa dels efectes de les citocines sobre el metabolisme i la fisiologia propis de l'hoste.

Agraïments

Marta Llovera és becària del Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFIA

- ARBÓS, J., F. J. LÓPEZ-SORIANO, N. CARBÓ i J. M. ARGILÉS (1992). The effects of tumour-necrosis factor- α (cachectin) on glucose metabolism in the rat. **Molec. Cell. Biochem.** 112: 53-59.
- ARGILÉS, J. M. (1986a). Has acetone a metabolic role in the conversion of fat to carbohydrate in mammals? **Trends. Biochem. Sci.** 11: 61-63.
- ARGILÉS, J. M. (1986b). **Bioquímica Perinatal** Papel de los cuerpos cetónicos en el feto. Fundación Ramón Areces, Madrid. p. 347-361.
- ARGILÉS, J. M. i J. AZCÓN-BIETO (1988). The metabolic environment of cancer. **Mol. Cell. Biochem.** 81: 3-17.
- ARGILÉS, J. M., C. GARCÍA-MARTÍNEZ, M. LLOVERA i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1992). The role of cytokines in muscle wasting: its relation with cancer cachexia. **Med. Res. Rev.** 12: 637-652..
- ARGILÉS, J. M. i E. HERRERA (1981). Lipids and lipoproteins in maternal and fetus plasma in the rat. **Biol. Neonate** 39: 37-44.
- ARGILÉS, J. M. i E. HERRERA (1989). Appearance of circulating and tissular ^{14}C -lipids after oral ^{14}C -tripalmitine in the late pregnant rat. **Metabolism** 38: 104-108.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1989a). Interleuquinas y factor necrótico tumoral: citoquinas en la lucha del huésped contra la infección y el cancer. **Mundo Científico** 9: 988-993.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1989b). Oxidation of branched-chain amino acids in tumour-bearing rats. **Biochem. Soc. Transac.** 17: 1045-1046.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1989c). Effects of tumour necrosis factor on hepatic amino acid uptake. **Biochem. Soc. Transac.** 17: 1044-1045.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1990a). Las bases moleculares de la caquexia asociada al cancer. **Med. Clín.** 94: 18-20.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1990b). Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? **Med. Hypoth.** 32: 151-155.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1990c). The oxidation of leucine in tumour-bearing rats. **Biochem. J.** 268: 241-244.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1990d). Tumour necrosis factor- α (cachectin) and hepatic amino acid uptake in the rat. **Biochem. J.** 266: 123-126.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1991a). Cáncer y caquexia. **Clín. Rur.** 357: 14-23.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1991b). The energy state of tumour-bearing rats. **J. Biol. Chem.** 266: 2978-2982.
- ARGILÉS, J. M. i F. J. LÓPEZ-SORIANO (1991c). The enzymatic activities of branched-chain amino acid catabolism in tumour-bearing rats. **Cancer Lett.** 61: 239-242.
- ARGILÉS, J. M., F. J. LÓPEZ-SORIANO, R. D. EVANS i D. H. WILLIAMSON (1989a). Interleukin-1 and lipid metabolism in the rat. **Biochem. J.** 259: 673-678.
- ARGILÉS, J. M., F. J. LÓPEZ-SORIANO, D. WIGGINS i D. H. WILLIAMSON (1989b). Comparative effects of tumour necrosis factor- α (cachectin), interleukin-1- β , and tumour growth on amino acid metabolism in the rat *in vivo*. **Biochem. J.** 261: 357-362.
- BAE, I. H. i R. H. FOOTE (1975). Carbohydrate and amino acid requirement and ammonia production of rabbit follicular oocytes matured *in vitro*. **Exp. Cell Res.** 91: 113-118.
- BAKER, N., C. SANDBORG, D. MORRIS i M. OOKHTENS (1974). Competition for host essential and nonessential fatty acids in Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Cancer Res.** 37: 2218-2225.
- BATTAGLIA, F. C. i G. MESCHIA (1978). Principal substrates of fetal metabolism. **Physiol. Rev.** 58: 499-527.
- BEUTLER, B. i A. CERAMI (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature** 320: 584-588.
- BEUTLER, B. i A. CERAMI (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Annu. Rev. Biochem.** 57: 505-518.
- BHARGHAVA, P. M. (1977). Regulation of cell division and malignant transformation. A new model for control by uptake of nutrients. **J. Theoret. Biol.** 68: 101-137.
- BLACKBURN, G. L., B. S. MAINI, B. R. BISTRAN i W. V. McDERMOTT, JR. (1977). The effect of cancer on nitrogen, electrolyte and mineral metabolism. **Cancer Res.** 37: 2348-2353.
- BODNAR, R. J., G. W. PASTERNAK, P. E. MANN, D. PAUL, R. WARREN i D. B. DONNER (1989). Mediation of anorexia by human recombinant tumor necrosis factor through a peripheral action in the rat. **Cancer Res.** 49: 6280-6284.
- BOXER, G. E. i T. M. DEVLIN (1961). Pathways of intracellular hydrogen transport. **Science** 134: 1495-1501.
- BRENNAN, M. F. (1981). Total parenteral nutrition in the cancer patient. **N. Engl. J. Med.** 305: 375-382.
- BUZBY, G. P., J. L. MULLEN, T. P. STEIN, E. E. MILLER, C. L. HOBBS i E. F. ROSATO (1980). Host-tumor interaction and nutrient supply. **Cancer** 45: 2940-2948.
- CAHILL, G. F. JR. (1970). Starvation in man. **N. Engl. J. Med.** 282: 668-675.
- CARRASCOSA, J. M., P. MARTÍNEZ i I. NÚÑEZ DE CASTRO (1984). Nitrogen movement between host and tumor in mice inoculated with Ehrlich ascitic tumor cells. **Cancer Res.** 44: 3831-3835.
- CARSWELL, E. A., L. J. OLD, S. GREEN, N. FIORE i B. WILLIAMSON (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72: 3666-3670.
- CEDERBAUM, A. I., F. F. BECKER i E. RUBIN (1976). Ethanol metabolism by a transplantable hepatocellular carcinoma: role of microsomes and mitochondria. **J. Biol. Chem.** 251: 5366-5374.

- CEDERBAUM, A. I. i E. RUBIN (1976). Fatty acid oxidation, substrate shuttles and activity of the citric acid cycle in hepatocellular carcinoma of varying differentiation. **Cancer Res.** 36: 2980-2987.
- CLARK, M. G. i G. S. PATTEN (1981). Epinephrine activation of phosphofructokinase in the perfused rat heart independent of changes in effector concentrations. **J. Biol. Chem.** 256: 27-30.
- CLARKE, E. F., A. M. LEWIS i C. WATERHOUSE (1978). Peripheral amino acid levels in patients with cancer. **Cancer** 42: 2909-2913.
- CLAUS, T. H. i S. J. PILKIS (1976). Regulation by insulin of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta** 421: 246-262.
- CLAUS, T. H., S. J. PILKIS i C. R. PARK (1975). Stimulation by glucagon of the incorporation of $U^{14}C$ -labelled substrates into glucose by isolated hepatocytes from fed rats. **Biochim. Biophys. Acta** 404: 110-123.
- CORI, C. F. (1981). The glucose-lactic acid cycle and gluconeogenesis. **Curr. Top. Cell. Regul.** 18: 377-387.
- COSTA, G. (1977). Cachexia, the metabolic component of neoplastic diseases. **Cancer Res.** 37: 2327-2335.
- COSTA, G. i J. F. HOLLAND (1962). Effects of Krebs-2 carcinoma on the lipid metabolism of male Swiss mice. **Cancer Res.** 22: 1081-1083.
- CURRIE, G. i A. CURRIE (1982). **Cancer, the biology of malignant disease**. Cancer, a disease of individuals: relationship between host and tumor. Casterfield Press, Northampton. p. 39-59.
- EDEN, E., S. EDSTROM, K. BENNEGARD, T. SCHERSTER i K. LUNDHOLM (1984). Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. **Cancer Res.** 44: 1718-1729.
- EXTON, J. H. (1972). Gluconeogenesis. **Metabolism.** 21: 945-990.
- EXTON, J. H. i C. R. PARK (1979). The stimulation of gluconeogenesis from lactate by epinephrine, glucagon and cyclic $3'$, $5'$ -adenylate in the perfused rat liver. **Pharmacol. Rev.** 18: 181-200.
- EVANS, R. D., J. M. ARGILÉS i D. H. WILLIAMSON (1989). Metabolic effects of tumour necrosis factor- α (cachectin) and interleukin-1. **Clin. Sci.** 77: 357-364.
- EVANS, R. D. i D. H. WILLIAMSON (1988). Tissue-specific effects of rapid tumour growth on lipid metabolism in the rat during lactation and on litter removal. **Biochem. J.** 252: 65-72.
- FELIG, P. (1979). **Endocrinology**. Starvation. Grune and Stratton, New York. Vol. 3. p. 1927-1940.
- FENSELAU, A., K. WALLIS i H. P. MORRIS (1975). Acetoacetate coenzyme A transferase activity in rat hepatomas. **Cancer Res.** 35: 2315-2320.
- FEO, F., A. CANUTO, G. BERTONE, R. GARCEA i P. PANI (1973). Cholesterol and phospholipid composition of mitochondria and microsomes isolated from Morris hepatoma 5123 and rat liver. **FEBS Lett.** 33: 229-232.
- FLORES, E. A., B. R. BISTRIAN, J. J. POMPOSELLI, C. A. DINARELLO, G. L. BLACKBURN i N. W. ISTFAN (1989). Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. **J. Clin. Invest.** 83: 1614-1622.
- FONG, Y., L. L. MOLDAWER, M. MARANO, H. WEI, A. BARBER, K. MANOGUE, K. J. TRACEY, G. KUO, D. A. FISCHMAN, A. CERAMI i S. F. LOWRY (1989). Cachectin/TNF or IL-1 α induces cachexia with redistribution of body proteins. **Am. J. Physiol.** 256: R659-665.
- FREDERICK, G. i R. W. BEGG (1954). Development of lipedemia during tumor growth in the rat. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.** 1: 14-18.
- FÜRST, P., J. BERGSTROM, B. HELLSTROM, E. VINNARS, O. HERFARTH, C. KLIPPEL, N. MERKEL, K. SCHULTIS, D. ELWYN, M. HARDY i J. KINNEY (1981). **Nutrition and metabolism in cancer**. Amino acid metabolism in cancer. George Thieme Verlag, Stuttgart. p. 75-89.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, C., F. J. LÓPEZ-SORIANO i J. M. ARGILÉS (1991). Interleukin-6 does not activate protein breakdown in rat skeletal muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** en premsa.
- GEIGER, K. (1963). Glycolysis by subcellular melanoma fractions and the effect of insulin, endotoxin and testosterone. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 100: 866-874.
- GOODLAD, G. A. J. i C. M. CLARCK (1972). Activity of gastrocnemius and soleus polyribosomes in rats bearing the Walker 256 carcinoma. **Eur. J. Cancer** 8: 647-651.
- GOSPODAROWICZ, D. i J. S. MORAN (1976). Growth factors in mammalian cell cultures. **Ann. Biochem.** 45: 531-557.
- GOUSTIN, A. S., E. B. LEOF, G. D. SHIPLEY i A. L. MOSES (1986). Growth factors and cancer. **Cancer Res.** 46: 1015-1029.
- HEBER, D., L. O. BYERLEY i R. T. CHLEBOWSKI (1985). Metabolic abnormalities in the cancer patient. **Cancer.** 55: 225-233.
- HERRERA, E. (1986). **Bioquímica Perinatal**. Aspectos básicos de las adaptaciones metabólicas en la madre durante la gestación y relaciones materno-fetales. Fundación Ramón Areces. Madrid. p. 17-39.
- HOCHSTEIN, P. (1957). Glycolysis by tumor mitochondria and the action of insulin. **Science.** 125: 496-498.
- HOLLAND, J. F. i T. OHNUMA (1979). Lessons from the study of induced alterations in amino acids in patients with cancer. **Cancer Treat. Rep.** 63: 1013-1024.
- HOLLEY, R. W. (1975). A unifying hypothesis concerning the nature of malignant growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 69: 2840-2841.
- HOLROYDE, C. P., R. S. AXELROD, C. L. SKUTCHES, A. C. HAFF, P. PAUL i G. A. REICHARD (1978). Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma. **Cancer Res.** 35: 3710-3714.
- HOLROYDE, C. P. i G. A. REICHARD (1981). Carbohydrate metabolism in cancer cachexia. **Cancer Treat. Rep.** 65: 61-65.
- JAMES, E. J., J. R. RAYE, E. L. GRESHAM, G. MESCHIA i F. C. BATTAGLIA (1972). Fetal oxygen consumption, carbon

- dioxide production and glucose uptake in a chronic preparation. **Pediatrics** 50: 361-371.
- JASANI, B., L. J. DONALDSON, J. G. RATCLIFFE i G. S. SOKHI (1978). Mechanisms of impaired glucose tolerance in patients with neoplasia. **Brit. J. Cancer** 38: 287-292.
- KAWAKAMI, M., T. MURASE, H. OGAWA, S. ISHIBASI, N. MORI, F. TAKAKU i S. SHIBATA (1987). Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. **J. Biochem.** 101: 331-338.
- KAWAMURA, I., L. L. MOLDAWER, B. R. BISTRAN i G. L. BLACKBURN (1980). Altered protein turnover in rats with progressive tumor growth. **Surg. Forum** 32: 441-444.
- KITADA, S., E. F. HAYS i J. F. MEAD (1981). Lipid mobilizing factor from tumors. **Prog. Lipid Res.** 20: 823-826.
- KNOPP, R. H., H. J. RUDER, E. HERRERA i N. FREINKEL (1970). Carbohydrate metabolism in pregnancy. vii Insulin tolerance during late pregnancy in the fed and fasted rat. **Acta Endocrinol.** 65: 352-360.
- KOOPS, D. H. (1972). Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. Does the change in energy metabolism enhance the potential for malignancy? **Science** 178: 127-133.
- KOVACEVIC, Z. i H. P. MORRIS (1972). The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. **Cancer Res.** 32: 326-333.
- KRALOVIC, B. C., E. A. ZEPP i R. J. CENEDELLA (1977). Studies of mechanism of carcass fat depletion in experimental cancer. **Eur. J. Cancer** 13: 1071-1079.
- KURZER, M. i M. M. MEGUID (1986). Cancer and protein metabolism. **Surg. Clin. N. Amer.** 66: 969-1001.
- LANDEL, A. M., W. G. HAMMOND i M. M. MEGUID (1985). Aspects of amino acid and protein metabolism in cancer-bearing states. **Cancer** 55: 230-237.
- LANOUE, K. F., J. G. HEMINGTON, T. OHNISHI, H. P. MORRIS i J. R. WILLIAMSON (1974). **Hormones and Cancer**. Defects in anion and electron transport in Morris hepatoma mitochondria. Academic Press, New York. p. 131-167.
- LAZO, P. A. (1981). Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. **Eur. J. Biochem.** 117: 19-25.
- LEPAGE, G. A., V. R. POTTER, H. BUSCH, L. HEIDELBERG i R. B. HURLBERT (1952). Growth of carcinoma implants in fed and fasted rats. **Cancer Res.** 12: 153-157.
- LEVIN, L. i W. GEVERS (1981). Metabolic alterations in cancer II. **S. Afr. Med. J.** 59: 553-556.
- LLOVERA, M., F. J. LÓPEZ-SORIANO i J. M. ARGILÉS (1992). Effects of tumour necrosis factor- α on protein turnover *in vivo*. **Biochem. J.**, en premsa.
- LOMBARDI, P., G. NORATA, F. M. MAGGI, G. CANTI, P. FRANCO, A. NICOLIN i A. L. CATAPANO (1989). Assimilation of LDL by experimental tumours in mice. **Biochim. Biophys. Acta** 1003: 301-306.
- LÓPEZ-SORIANO, F. J. i J. M. ARGILÉS (1985). Acetone levels in rat blood and tissues: effect of pregnancy and fasting. **IRCS Med. Sci.** 13: 161-162.
- LÓPEZ-SORIANO, F. J. i J. M. ARGILÉS (1986). Rat acetoacetate decarboxylase: its role in the disposal of 4C-ketone bodies by the fetus. **Horm. Metab. Res.** 7: 446-449.
- LUNDHOLM, K., A. BYLUND, J. HOLM i T. SCHERSTEN (1976). Skeletal muscle metabolism in patients with malignant tumour. **Eur. J. Cancer** 12: 465-473.
- LUNDHOLM, K., S. EDSTROM, I. KARLBERG, L. EKMAN i T. SCHERSTEN (1982). Glucose turnover, gluconeogenesis from glucerol and estimation of net glucose cycling in cancer patients. **Cancer** 50: 1142-1150.
- LUNDHOLM, K., L. EKMAN, S. EDSTROM, I. KARLBERG, F. JAGENBURG i T. SCHERSTEN (1979a). Protein synthesis in liver tissue under the influence of a methylcholanthrene induced sarcoma in mice. **Cancer Res.** 39: 4657-4661.
- LUNDHOLM, K., L. EKMAN, I. KARLBERG, S. EDSTROM i T. SCHERSTEN (1980). Comparison of hepatic cathepsin D activity in response to tumour growth and to caloric restriction in mice. **Cancer Res.** 40: 1680-1685.
- LUNDHOLM, K., G. HOLM i T. SCHERTEN (1979b). Insulin resistance in patients with progressive malignant disease. **Cancer Res.** 39: 1968-1972.
- MAHONY, S. M., S. A. BECK i M. J. TISDALE (1988). Comparison of weight loss induced by recombinant tumour necrosis factor with that produced by a cachexia-inducing tumour. **Br. J. Cancer** 57: 385-389.
- MAHONY, S. M. i M. J. TISDALE (1988). Induction of weight loss and metabolic alterations by human recombinant tumour necrosis factor. **Br. J. Cancer** 58: 345-349.
- MAHONY, S. M. i M. J. TISDALE (1989). Role of prostaglandins in tumour necrosis factor induced weight loss. **Br. J. Cancer** 60: 51-55.
- MASUNO, H., N. YAMASAKI i H. OKUDA (1984). Purification and characterization of a lipolytic factor (toxohormone-L) from cell-free fluid of ascites sarcoma 180. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** 20: 1174-1185.
- MCANDREW, P. F. (1986). Fat metabolism and cancer. **Surg. Clin. N. Amer.** 66: 1003-1012.
- MEDINA, M. A. i I. NÚÑEZ DE CASTRO (1990). Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. **Int. J. Biochem.** 22: 681-683.
- MIDER, G. B. (1951). Some aspects of nitrogen and energy metabolism in cancerous subjects. **Cancer Res.** 11: 821-829.
- MILES, J. M., R. A. RIZZA, M. W. HAYMOND i J. E. GERICH (1980). Effects of acute insulin deficiency on glucose and ketone body turnover in man. **Diabetes** 29: 926-930.
- MILLWARD, D. J., P. J. GARLICK, D. O. NANYELUGO i J. C. WATERLOW (1976). The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. **Biochem. J.** 156: 185-188.
- MIRALPEIX, M., J. AZCÓN-BIETO, R. BARTRONS i J. M. ARGILÉS (1990). The impairment of respiration by glycolysis in the Lewis lung carcinoma. **Cancer Lett.** 50: 173-178.

- MIRALPEIX, M., S. RIVERA, J. M. ARGILÉS i J. AZCÓN-BIETO (1989). The respiratory behaviour of Lewis carcinoma cells. **Cancer Biochem. Biophys.** 10: 227-233.
- MUELLER, P. S. i D. WATKIN (1961). Plasma unesterified fatty acid concentrations in neoplastic disease. **J. Lab. Clin. Med.** 57: 95-108.
- MUNRO, H. N. (1982). **The Liver, Biology and Pathobiology**. Interaction of liver and muscle in the regulation of metabolism in response to nutritional and other factors. Raven Press, New York. p. 677-691.
- NAKAHARA, W. i F. FUKUOKA (1948). Toxohormone. **Jpn. Med. J.** 1: 271-277.
- NIXON, D. W., S. B. HEYMSFIELD, A. E. COHEN, M. H. KUTNER, J. ANSLEY, D. H. LAWSON i D. RUDMAN (1980). Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients. **Am. J. Med.** 68: 683-690.
- NORTON, J. A., R. SHAMBERGER, T. P. STEIN, G. W. A. MILNE i M. F. BRENNAN (1981). The influence of tumor-bearing in protein metabolism in the rat. **J. Surg. Res.** 30: 456-462.
- ODELL, W. D. i A. R. WOLFSEN (1980). Hormones from tumors: are they ubiquitous? **Am. J. Med.** 68: 317-318.
- OHE, K., H. P. MORRIS i S. WEINHOUSE (1967). β -hydroxybutyrate dehydrogenase activity in liver and liver tumors. **Cancer Res.** p. 1360-1371.
- OLIFF, A., D. DEFEJO-JONES, M. BOYER, D. MARTÍNEZ, D. KIEFER, G. VUOCOLO, A. WOLFE i S. H. SOCHER (1987). Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. **Cell** 50: 555-563.
- OOKHTENS, M. i N. BAKER (1979). Fatty acid oxidation to H_2O by Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Cancer Res.** 39: 973-980.
- OOKHTENS, M., R. KANNAN, I. LYON i N. BAKER (1984). Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. **Am. J. Physiol.** 247: R146-R153.
- PALACIN, M., M. A. LASUNCIÓN, A. MARTÍN i E. HERRERA (1985). Decreased uterine blood flow in the diabetic pregnant rat does not modify the augmented glucose transfer to the fetus. **Biol. Neonate** 48: 197-203.
- PEDERSEN, P. L. (1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. **Progr. Exptl. Tumor Res.** 22: 190-274.
- PEDERSEN, P. L. i H. P. MORRIS (1974). Uncoupler-stimulated adenosine triphosphatase activity. Deficiency in intact mitochondria from Morris hepatomas and ascites tumor cells. **J. Biol. Chem.** 249: 3327-3334.
- PEINADO, J., F. J. LÓPEZ-SORIANO i J. M. ARGILÉS (1986). The metabolism of acetone in the pregnant rat. **Biosci. Rep.** 6: 983-989.
- PÉREZ RODRÍGUEZ, J., F. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. J. MÁRQUEZ, M. A. MEDINA, A. R. QUESADA i I. NÚÑEZ DE CASTRO (1987). Malate citrate cycle during glycolysis and glutaminolysis in Ehrlich ascites tumor cells. **Biochimie** 69: 469-474.
- POSTLE, A. D. i D. P. BLOXHAM (1982). Glucocorticoid hormones have a permissive role in the phosphorylation of L-type pyruvate kinase by glucagon. **Eur. J. Biochem.** 124: 103-108.
- QUESADA, A. R., M. A. MEDINA, J. MÁRQUEZ, F. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ i I. NÚÑEZ DE CASTRO (1988). Contribution by host tissues to circulating glutamine in mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cells. **Cancer Res.** 48: 1551-1553.
- RACKER, E. (1972). Bioenergetics and the problem of tumor growth. **Am. Sci.** p. 53-63.
- RACKER, E. (1976). Why do tumor cells have a high aerobic glycolysis? **J. Cell Physiol.** 89: 697-700.
- RAMÍREZ, I., M. LLOBERA i E. HERRERA (1983). Circulating triacylglycerols, lipoproteins and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. **Metabolism** 32: 333-341.
- RAPOPORT, S., J. ROST i M. SCHULTZE (1971). Glutamine and glutamate as respiratory substrates of rabbit reticulocytes. **Eur. J. Biochem.** 23: 166-170.
- REYNOLDS, M. L. i M. YOUNG (1971). The transfer of free α -amino nitrogen across the placental membrane in the guinea-pig. **J. Physiol.** 214: 583-597.
- RIVERA, S. (1985). **Introducció al metabolisme dels aminoàcids al carcinoma pulmonar de Lewis**. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.
- RIVERA, S., J. AZCÓN-BIETO, F. J. LÓPEZ-SORIANO, M. MIRALPEIX i J. M. ARGILÉS (1988). Amino acid metabolism in tumor-bearing mice. **Biochem. J.** 249: 443-449.
- ROBINSON, A. M. i D. H. WILLIAMSON (1980). Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. **Physiol. Rev.** 60: 143-187.
- ROFE, A. M., R. BAI i R. A. J. CONYERS (1986). Ketone-body metabolism in tumor-bearing rats. **Biochem. J.** 233: 485-491.
- ROSE, I. A. i J. V. B. WARMS (1967). Mitochondrial hexokinase, release, rebinding and location. **J. Biol. Chem.** 242: 1635-1645.
- SAEZ, S. (1971). Adrenal function in cancer: relation to the evolution. **Eur. J. Cancer.** 7: 381-387.
- SAUER, L. A. i R. T. DAUCHY (1983). Ketone body, glucose, lactic acid and amino acid utilization by tumors in vivo in fasted rats. **Cancer Res.** 43: 3497-3503.
- SAUER, L. A., J. W. STAYMAN i R. T. DAUCHY (1982). Amino acid, glucose and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. **Cancer Res.** 42: 4090-4097.
- SCHIEIN, P., D. KISNER, D. HALLER, M. BLECHER i M. HAMOSH (1979). Cachexia of malignancy: potential role of insulin in nutritional management. **Cancer** 43: 2070-2076.
- SCHNEIDER, W. C. i G. H. HOGEBOM (1950). Intracellular distribution of enzymes vi. The distribution of succinoxidase and cytochrome oxidase activities in normal mouse liver and in mouse hepatoma. **J. Natl. Cancer Inst.** 10: 969-975.

- SCHREIBER, J. R., W. X. BALCAVAGE, H. P. MORRIS i P. L. PEDERSEN (1970). Enzymatic and spectral analysis of cytochrome oxidase in adult and fetal rat liver and Morris hepatoma 3924A. **Cancer Res.** 30: 2497-2501.
- SEMB, H., J. PETERSON, J. TAVERNIER i T. OLIVECRONA (1987). Multiple effects of tumour necrosis factor on lipoprotein lipase *in vivo*. **J. Biol. Chem.** 262: 8390-8394.
- SHAPOT, V. S. (1979). On the multiform relationships between the tumor and the host. **Adv. Cancer Res.** 30: 89-150.
- SHERRY, B. A., J. GELIN, Y. FONG, M. MARANO, H. WEI, A. CERAMI, S. F. LOWRY, K. G. LUNDHOLM i L. L. MOLDAVER (1989). Anticachectin/tumor necrosis factor- α antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. **FASEB J.** 3: 1956-1962.
- SNELL, K. (1984). Enzymes of serine metabolism in normal developing and neoplastic rat tissues. **Adv. Enzyme Regul.** 22: 325-400.
- SNELL, K. (1985). Enzymes of serine metabolism in normal and neoplastic rat tissues. **Biochim. Biophys. Acta.** 843: 276-281.
- SNELL, K. i G. WEBER (1986). Enzymic imbalance in serine metabolism in rat hepatomas. **Biochem. J.** 233: 617-620.
- STEIN, T. P., J. C. ORAM-SMITH, M. J. LESKI, H. W. WALLACE i E. E. MILLER (1976). Tumor causes changes in host protein synthesis under different dietary situations. **Cancer Res.** 36: 3936-3940.
- STOVROFF, M. C., D. L. FRAKER, J. A. SWEDENBORG i J. A. NORTON (1988). Cachectin/tumor necrosis factor: a possible mediator of cancer anorexia in the rat. **Cancer Res.** 48: 4567-4572.
- THOMSON, M. i J. KOONS (1981). Modified lipoprotein lipase activities, rates of lipogenesis and lipolysis as factors leading to lipid depletion in c57BL6 mice bearing preputial gland tumor ESR 586. **Cancer Res.** 41: 3228-3232.
- TISDALE, M. J. (1991). Cancer cachexia. **Br. J. Cancer** 63: 337-342.
- TODARO, G. I. i J. E. DELARCO (1978). Growth factors produced by sarcoma virus transformed cells. **Cancer Res.** 38: 4147-4154.
- WAGLE, S. R., H. P. MORRIS i G. WEBER (1963). Comparative biochemistry of hepatomas v. Studies on amino acid incorporation in liver tumors of different growth rates. **Cancer Res.** 23: 1003-1007.
- WALLACH, D. F. H. (1975). **Membrane molecular biology of neoplastic cells**. Elsevier, Amsterdam.
- WARBURG, O. (1930). **Metabolism of tumors**. Arnold Constable, London.
- WARREN, R. S., H. F. STARNES, N. ALCOCK, S. CALVANO i M. F. BRENNAN (1988). Hormonal and metabolic response to recombinant human tumour necrosis factor in rat: *in vitro* and *in vivo*. **Am. J. Physiol.** 255: E206-E212.
- WARREN, S. (1932). The immediate cause of death in cancer. **Am. J. Med. Sci.** 184: 610-615.
- WATERHOUSE, C. i L. D. FENNINGER (1971). Carbohydrate metabolism in subjects with cancer. **Cancer Res.** 31: 1273-1278.
- WATERHOUSE, C., N. JEANPETRE i J. KEILSON (1979). Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. **Cancer Res.** 39: 1968-1972.
- WEBER, M. J., K. D. NAKAMURA i D. W. SALTER (1984). Molecular events leading to enhanced glucose transport in Rous sarcoma virus-transformed cells. **Fed. Proc.** 43: 2246-2250.
- WEINHOUSE, S., J. LANGAN, J. A. SHATTON i H. P. MORRIS (1973). **Tumor Lipids. Fatty acids as metabolic fuels of cancer cells**. Am. Oil Chemists Society Press. p. 14-20.
- WINDMUELLER, G. H. i A. E. SPAETH (1974). Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. **J. Biol. Chem.** 249: 5070-5079.
- YOUNG, M. (1981). Placental amino acid transfer and metabolism. **Placenta** 2: 177-184.
- YOUNG, V. R. (1977). Energy metabolism and requirements in the cancer patient. **Cancer Res.** 37: 2336-2347.
- YOUNG, V. R. i H. N. MUNRO (1978). N-methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview. **Fed. Proc.** 37: 2291-2300.
- ZIELKE, H. R., P. R. OZAND, J. T. TILDON, D. A. SEVDALIAN i M. CORNBATH (1976). Growth of human diploid fibroblasts in the absence of glucose utilization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 73: 4110-4114.
- ZIELKE, H. R., C. L. ZIELKE i P. T. OZAND (1984). Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. **Fed. Proc.** 43: 121-125.